BİYOKİMYA

Prof. Dr. E. Edip KEHA Doç. Dr. İrfan KÜFREVİOĞLU

Gözden Geçirilmiş ve Yenilenmiş
2. Baskı

DERYA KİTABEVİ
TRABZON
1993

Erol Boduroğlu
Tip 1-A 48648 07.02.1983

BİYOKİMYA

Prof. Dr. Edip KEHA
K.T.Ü. Tıp Fak.
Biyokimya Ana Bilim Dalı
TRABZON

Doç. Dr. İrfan KÜFREVİOĞLU
Atatürk Ün. Fen–Edebiyat Fak.
Biyokimya Anabilim Dalı
ERZURUM

DERYA KİTABEVİ
TRABZON – 1993

Yayınlayan :
DERYA KİTABEVİ
Uzun Sok. No:133/A
TRABZON
Tel : (03) 21 18 21

Baskı – Cilt :
FAKÜLTELER MATBAASI
Cemal Yener Tosyalı Cad. No : 133
VEFA / İSTANBUL
Tel : (1) 527 07 18
Fax : (1) 519 20 71

İ Ç İ N D E K İ L E R

	Sayfa
1. Bölüm: Biyokimyaya Giriş	**1-5**
2. Bölüm: Biyomoleküller ve Hücre Yapısı	**6-20**
2.1. Canlılardaki Elementler ve Önemleri	6
2.2. Canlılardaki Moleküller	8
2.3. Prokaryotik, Ökaryotik ve Fotosentetik Hücre Yapıları	11
2.3.a. Prokaryotik Hücre Yapısı	11
2.3.b. Ökaryotik Hücre Yapısı	14
2.3.c. Fotosentetik Hücreler	17
3. Bölüm: Su ve Sulu Çözeltilerin Özellikleri	**21-36**
3.1. Su	21
3.2. Hidrojen Bağı	23
3.3. Suyun Çözücü Özelliği	26
3.4. Sulu Çözeltiler	27
3.4.a. Çözünürlük	27
3.4.b. Koligatif Özellikler	27
3.4.c. Osmotik Basınç	28
3.4.d. Difüzyon	29
3.5. Suyun Öz İyonlaşması	30
3.6. Asitlik ve Bazlık	32
4. Bölüm: Proteinler	**37-88**
4.1. Amino Asitler	39
4.2. Amino Asitlerin Asit-Baz Özellikleri	45
4.3. Amino Asitlerin Işık Absorbsiyonu	49
4.4. Amino Asitlerin Kimyasal Reaksiyonları	50
4.5. Peptid Bağı ve Özellikleri	55
4.6. Proteinlerin Yapısı	57
4.7. Proteinlerin Sınıflandırılmaları	65
4.7.a. Konformasyonlarına Göre Proteinler	65
4.7.b. Bileşimlerine Göre Proteinler	65
4.8. Proteinlerin Denatürasyonu	67
4.9. Proteinlerin Asit-Baz Özellikleri	70
4.10. Proteinlerin Saflaştırılması	72

Sayfa

4.10.a. Molekül Büyüklüğü Esasına Dayanarak Proteinlerin Ayrılması 73
4.10.b. Çözünürlüklerindeki Farklılıkları Esasına Dayanarak Proteinlerin Ayrılması 76
4.10.c. Elektriksel Yük Esasına Dayanarak Proteinlerin Ayrılması 80
4.10.d. Seçimli Adsorbsiyon Esasına Dayanarak Proteinlerin Ayrılması 83
4.10.e. Spesifik Ligandların Esasına Dayanarak Proteinlerin Ayrılması 84
4.11. Proteinlerin Molekül Ağırlıklarının Tayini 85

5. Bölüm: Enzimler **89–134**
5.1. Enzimlerin Sınıflandırılması 90
5.2. Enzim Kofaktörleri 93
5.3. Enzim Kinetiği 95
5.3.a. Kimyasal Kinetik 96
5.3.b. Kataliz Olayı 97
5.3.c. Enzimlerin Katalizlediği Reaksiyonların Kinetiği 99
5.3.d. K_M ve V_{max} Değerlerinin Önemi 103
5.3.e. V_{max} ve K_M Değerlerinin Grafikle Tayini 105
5.3.f. Enzimli Reaksiyon Hızlarının Kofaktörlere Bağımlılığı 108
5.4. Enzim Katalizinin Mekanizması 109
5.5. Enzim Aktivitesi ve Miktarının Tayini 111
5.6. Enzim Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi 112
5.7. Enzim İnhibisyonu 114
5.8. İnhibisyonların Grafik Üzerinde İncelenmesi 118
5.9. Enzimlerin Spesifikliği (Özgüllüğü) 119
5.10. Enzimlerin Aktif Bölgeleri 122
5.11. Multienzim Sistemleri 123
5.12. Enzimatik Reaksiyonların Kontrol ve Düzenlenmesi 126
5.13. Allosterik Enzimlerin Kinetiği 128

	Sayfa
5.14.Enzimlerin Başka Kontrol Mekanizmaları	130
5.15.İzoenzimler (İzozimler)	134
6. Bölüm: Karbohidratlar	**135-163**
6.1. Monosakkaritler	135
6.1.a. Monosakkaritlerde Stereoizomerlik	136
6.1.b. Monosakkaritlerin Anomerik Şekilleri	141
6.1.c. Monosakkaritlerin Haworth Formülleri	143
6.1.d. Monosakkaritlerin Asit ve Bazlarla Etkileşmeleri	144
6.2. Monosakkaritlerin Önemli Türevleri	145
6.2.a. Glikozidler	145
6.2.b. O-Açil Türevleri	145
6.2.c. O-Metil Türevleri	146
6.2.d. Fenilosazonlar	146
6.2.e. Şeker Alkolleri	147
6.2.f. Şeker Asitleri	148
6.2.g. Deoksi Şekerler	150
6.2.h. Amino Şekerler	150
6.2.ı. Müramik ve Nöraminik Asitler	150
6.3. Disakkaritler	151
6.4. Polisakkaritler	153
6.4.a. Depo Polisakkaritleri	154
6.4.b. Yapı Polisakkaritleri	156
6.5. Bakteri Hücre Çeperleri	159
7. Bölüm: Lipidler ve Membran Yapısı	**164-186**
7.1. Yağ Asitleri	164
7.2. Nötral Yağlar	168
7.3. Fosfolipidler	170
7.4. Glikolipidler	172
7.5. Mumlar	173
7.6. Steroidler ve Terpenler	173
7.6.a. Steroidler	173
7.6.b. Terpenler	176

	Sayfa
7.7. Prostaglandinler	177
7.8. Biyolojik Membranların Yapısı	178
8. Bölüm: Nükleik Asitler	**187-198**
8.1. Nükleotidlerin Yapısı ve Özellikleri	187
8.1.a. Pürin ve Pirimidin Bazları	187
8.1.b. Nükleositler	190
8.1.c. Nükleotidler	191
8.2. Nükleik Asitlerin Yapısı ve Hücrelerdeki Dağılımı	194
8.2.a. Deoksiribonükleik Asit	194
8.2.b. Ribonükleik Asit	196
8.3. Nükleik Asitlerin Asit, Baz ve Enzimlerin Hidrolizi	197
9. Bölüm: Vitaminler	**199-232**
9.1. Suda Çözünen Vitaminler	199
9.1.a. Tiamin (B_1 Vitamini)	199
9.1.b. Riboflavin (B_2 Vitamini)	202
9.1.c. Nikotinamid (B_3 Vitamini)	204
9.1.d. Adenin (B_4 Vitamini)	207
9.1.e. Pantotenik Asit (B_5 Vitamini)	207
9.1.f. Piridoksin (B_6 Vitamini)	208
9.1.g. Biyotin	211
9.1.h. Folik Asit (B_{10} veya B_{11} Vitamini)	212
9.1.ı. Lipoik Asit	214
9.1.i. Kobalamin (B_{12} Vitamini)	217
9.1.j. C Vitamini	220
9.1.k. Suda Çözünen Diğer Büyüme Faktörleri	221
9.2. Yağda Çözünen Vitaminler	222
9.2.a. A Vitamini	222
9.2.b. D Vitamini	226
9.2.c. E Vitamini	228
9.2.d. K Vitamini	231

	Sayfa
10. Bölüm :Metabolizma ve Biyoenerjetik	**233-258**
10.1. Hücrelerin Karbon ve Enerji Kaynakları	233
10.2. Karbon ve Azot Devri	236
10.3. Serbest Enerji	238
10.4. ΔG ve Denge Sabiti	241
10.5. ATP (Adenozin Trifosfat)	244
10.6. Metabolizmadaki Elektron Taşıyıcıları	250
10.7. Katabolizma ve Anabolizma	253
11. Bölüm : Karbohidrat Metabolizması	**259-349**
11.1. Karbohidratların Sindirimi ve Cori Devri	259
11.2. Glikoz	261
11.2.a. Glikoliz Reaksiyonları	263
11.2.b. Glukoz Dışındaki Diğer Monosakkaritlerin Glikolize Girişi	272
11.2.c. Piruvatın Etanol, Laktat ve Asetil CoA'ya Çevrilmesi	275
11.2.d. 2,3-Difosfogliseratın (2,3-DPG) O_2'Taşınmasındaki Rolü	278
11.3. Sitrik Asit Devri (TCA Devri)	280
11.3.a. Piruvat Dehidrogenaz Kompleksi: Bir Multienzim Sistemi	280
11.3.b. TCA Devri Reaksiyonları	283
11.3.c. TCA Devri Ara Bileşiklerinin Biyosentetik Önemi	292
11.4. Glioksilat Devri	293
11.5. Oksidatif Fosforilasyon	294
11.5.a. Redoks Potansiyelleri ve Serbest Enerji Değişimleri	295
11.5.b. Elektron Transport Zinciri (Solunum Zinciri)	299
11.5.c. Fosforilasyon ve Kemozmotik Teori	306

Sayfa

11.5.d. Glikolizde Oluşan NADH'ın Solunum Zincirine Girişi 311
11.5.e. Oksigenazlar Vasıtasıyla Oksijen Kullanımı 314
11.6. Pentoz Fosfat Yolu 317
11.6.a. Pentoz Fosfat Yolu Reaksiyonları 317
11.6.b. Hücre İçinde Glukoz-6-Fosfat Akibetinin Kontrolü 322
11.6.c. Pentoz Fosfat Yolunun Yağ Dokusu ve Eritrositlerdeki Önemi 325
11.7. Glukoneogenez 327
11.7.a. Glukoeneogenezin Reaksiyonları 328
11.7.b. Piruvat Karboksilaz Enziminin Allosterik Özellikleri ve Biyotinin Etki Mekanizması 331
11.8. Fotosentez ile Karbohidrat Sentezi 332
11.8.a. Fotosentezin Işık Reaksiyonları 333
11.8.b. Fotosentezin Karanlık Reaksiyonları 337
11.9. Glikojen Metabolizması 341
11.9.a. Glikojenin Yıkımı 342
11.9.b. Glikojen Sentezi 345

12. Bölüm : Lipid Metabolizması 350-395
12.1. Yağların Sindirimi ve Taşınması 350
12.2. Yağ Asitlerinin Oksidasyonu 354
12.2.a. Yağ Asitlerinin Aktifleştirilmeleri ve Mitokondri Matriksine Taşınmaları 356
12.2.b. Doymuş Yağ Asitlerinin β-Oksidasyonu 359
12.2.c. Doymamış Yağ Asitlerinin β- Oksidasyonu 361
12.2.d. Tek Karbon Sayılı Yağ Asitlerinin Oksidasyonu 364
12.2.e. Keton Cisimleri 365

	Sayfa
12.3. Yağ Asitlerinin Sentezi	367
12.3.a. Doymuş Yağ Asitlerinin Sentezi	368
12.3.b. Doymamış ve Daha Uzun Zincirli Yağ Asitlerinin Sentezi	376
12.3.c. Yağ Asidi Sentezinin Kontrol Mekanizması	377
12.4. Kolesterol Metabolizması	378
12.4.a. Kolesterol Sentezi	379
12.4.b. Safra Asitlerinin Sentezi	384
12.4.c. Steroid Hormonlarının Sentezi	385
12.5. Triaçilgliseroller, Fosfolipidler ve Glikolipidlerin Sentezi	389
12.5.a. Triaçilgliserol ve Fosfogliseridlerin Sentezi	389
12.5.b. Sfingolipidler ve Glikolipidlerin Sentezi	393
13. Bölüm : Amino Asit Metabolizması	**396-432**
13.1. Proteinlerin Sindirimi	396
13.2. Amino Asitlerin Yıkımı ve Üre Devri	398
13.2.a. α-Amino Grubunun Uzaklaştırılması	399
13.2.b. Amino Asitlerin Karbon İskeletlerinin Yıkımı	405
13.3. Amino Asitler, Türevleri ve Porfirinlerin Sentezi	409
13.3.a. Azot Fiksasyonu (Azotun Tesbit Edilmesi)	410
13.3.b. Amino Asitlerin Biyosentezi	413
13.3.c. Amino Asitlerden Türetilen Önemli Biyomoleküller	420
13.3.d. Porfirinlerin Sentezi	425
14. Bölüm : Nükleotid Metabolizması	**433-447**
14.1. Pürin Halkasının Biyosentezi	433
14.2. Pirimidin Halkasının Sentezi	438
14.3. Pürin ve Pirimidin Yıkımı	443
14.4. NAD^+, FAD ve CoA'nın Sentezi	444

Sayfa

15. Bölüm : Metabolizmanın Bütünlüğü ve Metabolik Koordinasyon 448-468

15.1. Metabolizmanın Genel Stratejisi 448
15.2. Genel Metabolik Kontrol Mekanizmaları 450
15.3. Önemli Bazı Metabolik Yolların Kontrolü 452
15.4. Metabolizmanın Kavşak Noktalarını Teşkil Eden Bileşikler 455
15.5. Bazı Organların Metabolik Özellikleri 458
15.6. Kan Glukoz Seviyesinin Karaciğer Tarafından Denetimi 463
15.7. Uzun Süreli Açlık Durumunda Metabolik Adaptasyon 465

16.Bölüm :DNA: Genetik Rolü, Yapısı ve Replikasyon 469-489

16.1. DNA'nın Yapısı ve Genetik Rolü 469
16.1.a. Watson-Crick DNA Modeli 471
16.1.b. DNA Moleküllerinin Sulu çözeltilerdeki özellikleri 476
16.2. DNA Replikasyonu 478
16.2.a. DNA Sentezinde Rol Alan Enzimler ve Proteinler 480
16.2.b. DNA Üzerindeki Hasarların Onarımı 487

17. Bölüm : RNA, Transkripsiyon, Genetik Şifre ve Protein Sentezi 490-529

17.1. RNA'nın Yapısı ve Çeşitleri 490
17.1.a. RNA'nın Yapısı 491
17.1.b. RNA Çeşitleri 492
17.2. RNA Sentezi (Transkripsiyon) 492
17.2.a. RNA Polimeraz Enzimi ve Fonksiyonu 493
17.2.b. RNA'ların Sentez Sonrası Modifikasyonu 498
17.2.c. Ökaryotik RNA Polimeraz Enzimleri 499
17.2.d. Ökaryotik mRNA'ların Sentezi ve Özellikleri 500

	Sayfa
17.3. Genetik Şifre ve Gen-protein İlişkileri	501
17.3.a. Genetik Şifre ve Bazı Özellikleri	502
17.3.b. Gen-Protein İlişkileri	506
17.3.c. Mutasyon Çeşitleri	507
17.3.d. Mitokondri ve Kloroplastlardaki Genetik Bilgi	508
17.4. Protein Sentezi ve Kontrol Mekanizması	509
17.4.a. Amino Asitlerin Aktifleştirilmesi	510
17.4.b. Transfer RNA'nın Yapısı	513
17.4.c. Prokaryotik ve Ökaryotik Ribozomlar	516
17.4.d. Protein Sentezi Safhaları	517
17.4.e. Proteinlerin Sentez Sonrası Modifikasyonu	524
17.4.f. Protein Sentezini İnhibe Eden Antibiyotikler	526
17.4.g. Protein Sentezinin Kontrolü	527
18. Bölüm : Hormonlar	**530-551**
18.1. Memelilerde Endokrin Sistemin Organizasyonu	530
18.2. Hormon Reseptörleri ve İntraselüler (Hüçre İçi) Haberci Maddeler	534
18.3. Adrenalin ve cAMP	535
18.4. Glukagon	540
18.5. cAMP'nin Aracı Olduğu Diğer Endokrin ve Düzenleyici Sistemler	541
18.6. İnsulin : Sentezi, Depolanması ve Salgılanması	542
18.7. Steroid Hormonları	546
18.8. Tiroid Bezi Hormonları	547
18.9. Parathormon, 1,25-Dihidroksikolekalsiferol ve Kalsitonin	550
Kaynaklar	**552**

1.BÖLÜM: B İ Y O K İ M Y A Y A G İ R İ Ş

Biyokimyaya başlarken ona yirminci asrın harikalar ilmi demek hiçte mübalağalı bir tanıtma değildir. Çünkü, esasta biyoloji ve kimya temel bilimlerinin bir çalışma alanı olan biyokimya, günümüzde başta tıp olmak üzere veterinerlik, eczacılık, diş hekimliği, ziraat, gıda teknolojisi ve hatta mühendislik gibi uygulamalı sahalarda da müracaat edilen, tatbik imkânı bulan bir bilim dalı haline gelmiştir. Sözü edilen çok geniş kullanım spektrumu içerisinde biyokimya, bir takım alt dallara da ayrılmıştır. Meselâ, klinik kimya, fizyolojik kimya, zirai biyokimya, moleküler biyoloji, biyokimya mühendisliği, gıda enzimolojisi, gen mühendisliği v.b. gibi.

Biyokimyaya ilgi, insanların yüzyıllar boyu devam eden hayatın sırrını çözme arzularından kaynaklanmaktadır. Fakat bugün modern ve müsbet biyokimya ilminin gayesi, hayatın sırrını halletmek değil, canlılığın devamında rol oynayan kimyasal bileşikleri tanımak, özelliklerini ve birbirleriyle etkileşmelerinin sebeplerini araştırmak şeklinde tesbit edilmektedir.

Başlangıçta canlı varlıkların ve yapılarında bulunan kimyasal bileşiklerin genel özelliklerini ele almak ve bunları tanıtmak, öğrenciye biyokimyanın nasıl bir bilim dalı olduğu hakkında umumi bir kanaat verecektir.

Canlı varlıklar cansız moleküllerden ibarettir. Bu moleküller tek tek incelendiği zaman, cansız maddelerin bağlı bulundukları bütün kimyasal ve fiziksel kanunlara uydukları görülür. Ama, bunun yanısıra biyomoleküller olağanüstü özellikler gösterir. Bu özelliklere geçmeden önce, canlı bir organizmayı çevresindekilerden ayıran göz kamaştırıcı özelliklerini inceleyelim:

Canlı varlıklar, en küçük bakteriden en yüksek can-

lıya kadar, son derece karmaşık ve teşkilatlı bir yapıya sahiptir. Birçok çeşit kompleks molekülleri ihtiva eden bir iç âlemleri vardır. İnsanı hayrete bırakan birçok türlere ayrılmışlardır. Fakat bunların çevreleri çok basit yapıda toprak, hava, su, kaya gibi nisbeten yapısı fazla organize olmamış cansız varlıklarla doludur.

İkinci olarak, canlı varlıkların yapısında bulunan her organ, doku, hücre ve hatta molekülün bile bir yaratılış gayesi ve bir görevi vardır. Herhangi bir bileşiğin bile insan vücudundaki fonksiyonundan söz etmek mantığa uygun gelirken, meselâ dağın yamacındaki bir taş için oradaki vazifesini sormak son derece manasız gözükmektedir.

Üçüncü olarak, canlı organizmalar çevrelerinden enerji alıp onu kullanabileceği hale dönüştürdükten sonra, ondan kendi yapısını teşkil eden kararlı molekülleri basit besin maddelerinden sentezler ve mekanik harekette kullanır. Cansızlar ise dışarıdan ışık ve ısı halinde enerji aldıkları zaman daha gelişigüzel bir hale dağılma eğilimi gösterirler.

Belki canlı varlıkların en fevkâlade yönleri üremeleri ve kendilerinden kendileri gibi bir canlının teşekkülüdür. Bir cansız yığından milyonlarca yıl geçse de böyle bir hadise beklenemez.

Canlıların yukarıda saydığımız genel özelliklerinden sonra, onları meydana getiren biyomoleküllerin karakteristiklerini de ele alalım:

Canlılarda biyomoleküller olağanüstü bir çeşitlilik ve komplekslik arzederler. En küçük hücreler olan bakteriler bile binlerce farklı organik bileşik ihtiva ederler. Meselâ, üzerinde biyokimyacıların en çok çalıştığı ve biyokimyasal olayları en fazla açıklığa kavuşturulan Escherichia coli bakterisi, yaklaşık 5000 farklı organik bileşiğe sahiptir. Mikroskop altında on-

binlerce defa büyütülerek görülebilen ve gramın beşyüz milyarda biri kadar bir ağırlığa sahip olan bu bakterideki bileşiklerin 3000 kadar çeşidi protein, bin kadarı nükleik asittir. E. coli'deki proteinlerin hiçbirisi insanda bulunanların aynısı değildir. Hatta aynı fonksiyonu gören proteinler dahi farklıdır. Gerçekten her canlı türü, kendisine has protein ve nükleik asitlere sahiptir. Basit bir E.coli hücresinden insana kadar 1.200.000'den fazla canlı türü olduğunu düşünürsek, bütün canlıların 10^{10} -10^{12} çeşit protein, 10^{10} çeşit nükleik asit molekülü taşıdıkları hesaplanır. Bu rakamları organik kimyacıların laboratuvarlarda sentezledikleri bir milyona yakın organik bileşik sayısıyla karşılaştırırsak canlılardaki molekül çeşidinin yanında çok küçük kaldığını görürüz.

Bu derece çeşitliliğe rağmen, protein ve nükleik asitler çok basit belli sayıda yapı taşlarından yapılmaktadır. Meselâ, yeryüzündeki canlılarda bulunan bütün proteinler 20 çeşit amino asitten, nükleik asitler ise 8 çeşit mononükleotidden sentezlenmektedir. Aynen 29 harfle ciltler dolusu kitapların yazılması gibi, bu bileşiklerde de amino asitler ve mononükleotidler, kendilerinden istenilen biyolojik fonksiyonu görebilecek protein ve nükleik asitleri vermek üzere sonsuz bir ilimle sıralanmışlardır.

Canlılarda bulunan biyomoleküllerin bu derece çeşitli olmaları hiçbir zaman israf görüntüsü vermemektedir. Çünkü canlılık hali milyonlarca görevin yerine getirilmesini gerektirmektedir. Gerçekten herbir molekül hücre içerisinde maksimum verimle çalışır ve bazen de birden farklı fonksiyon görür. Özetle metabolizma olaylarında her bileşik en ekonomik şekilde kullanılmaktadır.

Canlı organizmalardaki bütün kimyasal reaksiyonlar, enzim adı verilen protein yapısındaki bileşikler tarafından katalizlenmektedir. Enzimler sayesinde, kimya laboratuvarlarında günler ve haftalar sürebilecek bir sentez, seri halde reaksiyonlarla saniyenin binde biri kadar süre

içinde gerçekleştirilir. Bu reaksiyonların verimi % 100 olup, hiçbir yan ürün de oluşmamaktadır. Meselâ, yine bir E.coli hücresini ele alalım; bu bakteri binlerce çeşit kompleks organik bileşiğini üç basit moleküldən sentezlemektedir: H_2O, amonyak ve glukoz. Burada bir kimyagerin rüyasında bile göremiyeceği bir maharet sergilenmektedir. Eğer bir kimyagerden aynı çıkış maddelerini kullanarak bir amino asit ve bir lipidin yalnız bir kap içinde sentezi istense, buna hiç yanaşmıyacaktır. Çünkü, bir kap içinde yalnız bir tek reaksiyon gerçekleştirilebilir ve yukarıdaki başlangıç maddelerinden istenilen sentezlerin yapılabilmesi de yüzden fazla reaksiyonla mümkün olur. Ama E.coli hücresini bir kap kabul etsek, 5000 çeşit organik bileşik, basit su, amonyak ve glukozdan 20 dakika içinde birarada yapılmakta ve hücre bölünmektedir. Bu bileşiklerin belirli oranlarda yapılması da işin bir başka karmaşık yönünü oluşturmaktadır.

Görüldüğü gibi biyokimyanın meşgul olduğu saha, incelikler ve hârikulâde özelliklerle doludur. Bu inceliklerin ve özelliklerin araştırılıp ortaya çıkarılması da, ancak çok hassas ayırma, teşhis ve tayin tekniklerinin ve metodlarının geliştirilmesinden sonra gerçekleşebilmiştir. Bugün, bir ortaokul öğrencisinin bile tanıdığı DNA'nın genetik bilgileri taşıdığını, 1940'ların öncesinde en büyük bilim adamları dahi bilmiyorlardı. Bu molekülün yapısı henüz 1953 yılında belirlenebilmiştir. Küçük bir protein olarak bilinen insulinin amino asit sıralanışı yine 1953'te ortaya koyulabilmiştir. Amino asit sıralanışı ile DNA üzerindeki bazların sıralanışı arasındaki münasebet 1960'lara doğru keşfedilebilmiştir. Özetle diyebiliriz ki, biyokimyanın temelini oluşturan konular son 30 yıl içerisinde açığa kavuşturulabilmiştir. Bugün biyokimya, araştırma alanları içerisinde en aktif olanlarındandır. Artık biyokimyacılar, biyoloji ve tıbbın en zor ve derin problem ve konularına el atmışlardır. "Tek bir hücreden kas, karaciğer ve beyin gibi dokulardaki farklı hücreler nasıl oluşmaktadır? Yani hücre nasıl farklılaşmaktadır? Kompleks bir organı teşkil etmek üzere

hücreler birbirlerini nasıl tanımaktadır? Hücrelerin büyümesi nasıl kontrol edilmektedir? Hafızanın mekanizması nedir? Kanserin sebepleri nelerdir? Şizofreni nasıl ortaya çıkmaktadır? "gibi bir zamanlar yanaşılmaya dahi cesaret edilemeyen soruların artık cevapları araştırılmaktadır. Ayrıca, biyolojik sistemlerden yararlanarak birtakım ürünlerin elde edilmesini sağlayan biyoteknolojiye biyokimyanın katkısı son yıllarda büyük önem kazanmıştır. 21. yüzyılda insanoğlunun büyük şeyler beklediği biyoteknoloji ile nüfus artışının doğurabileceği gıda kaynakları meselesine çare aranmaktadır. Tıbbî teşhis ve tedavide kullanılmak üzere birçok biyoteknolojik ürün günümüzde bile piyasaya sunulmuştur.

2.BÖLÜM: B İ Y O M O L E K Ü L L E R V E H Ü C R E Y A P I S I

Bu bölümde, önce canlıların hangi elementlerden ibaret olduğu ve bu elementlerin seçiliş sebepleri kimyasal özellikleri yönünden ele alınacak, daha sonra da küçük ve büyük biyomoleküllerin basit başlangıç maddelerinden oluşum sırası bir hücre biriminin meydana gelişine kadar incelenecek ve son olarak da prokaryotik, ökaryotik ve fotosentetik hücre yapıları hakkında karşılaştırmalı bilgi verilecektir.

2.1. CANLILARDAKİ ELEMENTLER VE ÖNEMLERİ

Canlıların yapılarında bulunan elementlerin çeşit ve miktarları, litosferdekinden oldukça farklıdır. Yerkabuğunda mevcut olan 92 elementten 27'si canlıların bileşeni olup, bunların da yalnız 16 tanesine her çeşit organizmada rastlanılmaktadır. Bu elementlerin canlı varlıklardaki dağılımı da yerkabuğundaki oranlarıyla aynı değildir. En bol olarak bulunan dört element karbon, hidrojen, oksijen ve azot, birçok hücrelerin kütlelerinin yüzde 99'unu teşkil ederler; litosferde ise en çok bulunan ilk dört element oksijen, silisyum, alüminyum ve demirdir. Kalsiyum, fosfor, sodyum, mangan, potasyum, klor ve kükürt genellikle yüzde 0,05 ile 1 arasında değişen oranlarda bulunur. Diğer bazı elementler çok daha az miktarlarda mevcuttur. Tablo 2.1'de bu elementlerin listesi verilmiştir.

Acaba karbon, hidrojen, oksijen ve azot canlı yapıları için neden en uygun elementlerdir?

Önce, bu dört elementin ortak özelliği kovalent bağ yapabilmeleridir. En dış yörüngelerini tamamlamak için hidrojenin bir, oksijenin iki, azotun üç, karbonun ise dört elektrona ihtiyacı vardır. Oksijen, azot ve karbon birden fazla elektron çiftini ortaklaşa kullanabilecekleri için iki, üç ve hatta dört bağ meydana getirebilir-

Tablo 2.1. Biyomoleküllerde bulunan elementler. İlk 16 elemente her canlıda rastlanılmaktadır.

Organik yapının temel elementleri	
Karbon	C
Hidrojen	H
Oksijen	O
Azot	N
Fosfor	P
Kükürt	S
İyon halinde ve bol miktarda bulunan elementler	
Sodyum	Na^{+}
Potasyum	K^{+}
Magnezyum	Mg^{+2}
Kalsiyum	Ca^{+2}
Klor	Cl^{-}
Eser elementler	
Demir	Fe
Bakır	Cu
Çinko	Zn
Mangan	Mn
Kobalt	Co
İyot	I
Molibden	Mo
Vanadyum	V
Nikel	Ni
Krom	Cr
Fluor	F
Selenyum	Se
Silisyum	Si
Kalay	Sn
Bor	B
Arsenik	As

ler. Bunun sonucu olarak da birçok çeşit kimyasal bileşik oluşturabilirler. Bu dört element ayrıca kovalent bağ yapabilen en hafif elementlerdir. Bir kovalent bağın sağlamlığı onu meydana getiren elementlerin atom ağırlığıyla

ters orantılı olduğu göz önüne alınırsa, bu elementlerin niçin seçildiği daha iyi anlaşılır.

Çok önemli bir başka nokta da, karbon atomlarının birbirleriyle etkileşerek oldukça kararlı kovalent karbon-karbon bağı meydana getirebilmeleridir. Hatta bir karbon atomu dört ayrı karbon atomu ile de bağlanabilmektedir. Bu şekilde çok sayıdaki organik bileşiğin karbon iskeleti ortaya çıkar. Bunun yanısıra karbon, azot, oksijen ve hidrojenle de kararlı bağlar yaparak birçok fonksiyonel grubun oluşmasını sağlar. Organik bileşiklerin üç boyutlu uzayda sonsuz çeşitte olmasını sağlayan bir diğer özellik te, karbon atomunun sp^3 hibridleşmesi yaparak bağlarının bir dört yüzlünün köşelerine yönelmiş olmalarıdır. Karbondan başka hiçbir element bu kadar çok çeşitte kararlı bileşik yapamaz. Periyodik cetvelde karbonun hemen altında yer alan silisyum, kimyasal özellikleri karbona en çok benzeyen elementtir. Aynı zamanda Si-Si bağı da kolayca teşekkül edebilir. Hatta litosferde karbondan daha boldur. Fakat, Si-Si bağları oksijen karşısında kararsız olup, silikatların ve kuvartz gibi silisyum dioksit polimerlerinin oluşmasına yol açar.

Canlıların yapısında bulunan organik bileşiklerde karbon oldukça indirgenmiş, yani hidrojenlenmiş haldedir. Yer kabuğunda ise oksitlenmiş (yükseltgenmiş) bikarbonat ve karbonat şeklindedir. Atmosferde oksijen bol olduğundan, karbon ve hidrojen CO_2 ve H_2O'ya kolayca oksitlenir. İndirgenmiş karbon bileşiklerinin CO_2 ve H_2O'dan sentezi için canlı organizmaların serbest enerji harcamaları gerekir.

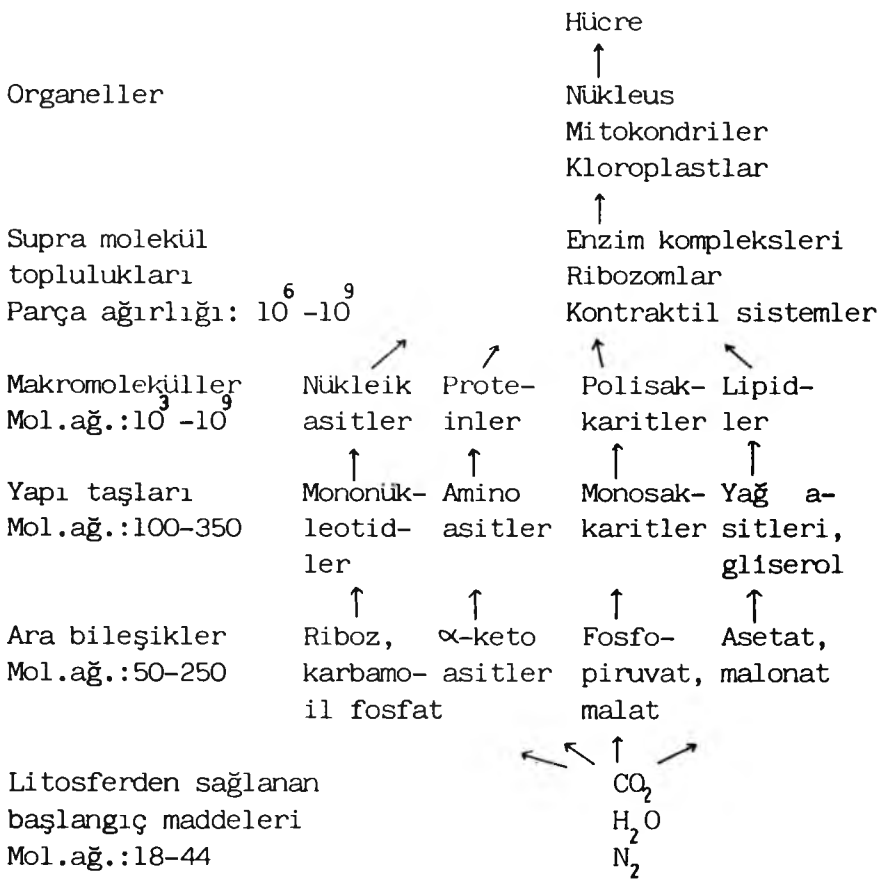
2.2. CANLILARDAKİ MOLEKÜLLER

Canlı organizmalarda bulunan bileşikler, molekül ağırlığı ve karmaşıklık yönünden Şekil 2.1'de sıralanmışlardır. Bütün organik biyomoleküller, çevreden sağlanan su, CO_2 ve N_2 gibi basit başlangıç maddelerinden yapılmaktadır. Bu başlangıç maddeleri, canlılar tarafın-

dan birtakım metabolik ara bileşikleri yoluyla, molekül ağırlıkları 100 ile 350 arasında değişen ve makromoleküllerin yapı taşlarını teşkil eden biyomoleküllere dönüştürülürler. Bu yapı taşı hükmündeki moleküller kovalent bağlarla birleşerek makromolekülleri teşkil ederler. Bunların molekül ağırlıkları hayli yüksektir. Amino asitler proteinleri, mononükleotidler nükleik asitleri, monosakkaritler polisakkaritleri ve yağ asitleri de bazı lipitleri meydana getirirler. Burada lipidler nisbeten düşük molekül ağırlığına sahip olmalarına rağmen (750-2500 dalton) makromolekül olarak ele alınmıştır.

Bundan sonraki daha yüksek seviyede düzenlenme, makromoleküllerin oluşturdukları "supra moleküller" adı verdiğimiz komplekslerdir. Meselâ, lipoproteinler lipid ve proteinlerin, ribozomlar nükleik asit ve proteinlerin kovalent olmayan bağlarla meydana getirdikleri supra moleküllerdir. Bunların teşekkülü iyonik ve hidrofobik etkileşmeler, hidrojen bağları ve Van der Waals çekim kuvvetleri ile gerçekleşmektedir. Bu bağlar çok zayıf olmalarına rağmen, oluşturdukları kompleksler oldukça kararlıdır. Bu kararlılık üç boyutlu uzayda moleküllerin geometrik olarak birbirlerine uygunluk göstermesi sonucu hasıl olmaktadır.

Hücre yapısını oluşturan en yüksek seviyedeki moleküller düzenlenme, supramoleküllerin kovalent olmayan benzer bağlarla biraraya gelmesi sonucu ortaya çıkan organellerdir. Hücre membranları, mitokondriler, nükleus, mikrocisimler, vakuoller ve kloroplastlar bu yapıya birer örnek olarak zikredilebilir.



Şekil 2.1. Başlangıç maddelerinden hücre yapısına kadar biyomoleküllerin oluşum sırası.

Tablo 2.2'de Esherichia coli hücresinde bulunan makromoleküllerin ve diğer bileşiklerin yüzdeleri ve çeşitleri verilmiştir. Burada görüldüğü gibi canlı hücrelerde en çok protein bulunmaktadır. Diğer bütün canlı hücrelerde iskelet, kıl, tüy ile nişasta ve yağ depoları dışında dört makromolekül hemen hemen aynı oranları muhafaza ederler.

Tablo 2.2. Bir E.coli hücresinin moleküler bileşimi.

	Yüzde ağırlık	Herbir moleküler çeşit
Su	70	-
Proteinler	15	3000
DNA	1	1
RNA	6	1000
Karbohidratlar	3	50
Lipidler	2	40
Yapı taşları ve ara bileşikler	2	50
Anorganik iyonlar	1	12

Tablo 2.3'de bazı hücre bileşenleriyle biyomoleküllerin yaklaşık uzunluk ve ağırlıkları verilmiştir. Bundan faydalanarak hücre büyüklükleriyle bileşenlerin kütleleri arasında bir karşılaştırma yapabiliriz.

2.3.PROKARYOTİK, ÖKARYOTİK VE FOTOSENTETİK HÜCRE YAPILARI

Biyokimya dersi boyunca, biyomoleküllerin şekil ve fonksiyonları, mitokondriler, kontraktil sistemler, ribozomlar, kloroplastlar, membranlar ve hücre çeperleri gibi hücre bileşenleriyle bağlantı kurularak anlatılacaktır. Bundan dolayı öncelikle üç önemli hücre türü olan prokaryotik, ökaryotik ve fotosentetik hücrelerin bileşenleri, boyutları, moleküler terkipleri, özellik ve fonksiyonları yönünden incelenecektir.

2.3. a. Prokaryokit Hücre Yapısı

Prokaryotlar çok küçük ve basit hücrelerdir. Yalnız hücre membranı olup, nükleusu membransızdır. Aynı zamanda mitokondri ve endoplazmik retikuluma da sahip değildirler. Eubacteria, mavi-yeşil algler, spirocheteler, rickettsialar ve mikoplazmalar prokaryotik organizmalardır. Çekirdek bölgesinde sıkı bir yumak şeklinde tek bir DNA çift sarmalı molekülünden ibaret bir tane kromozomu

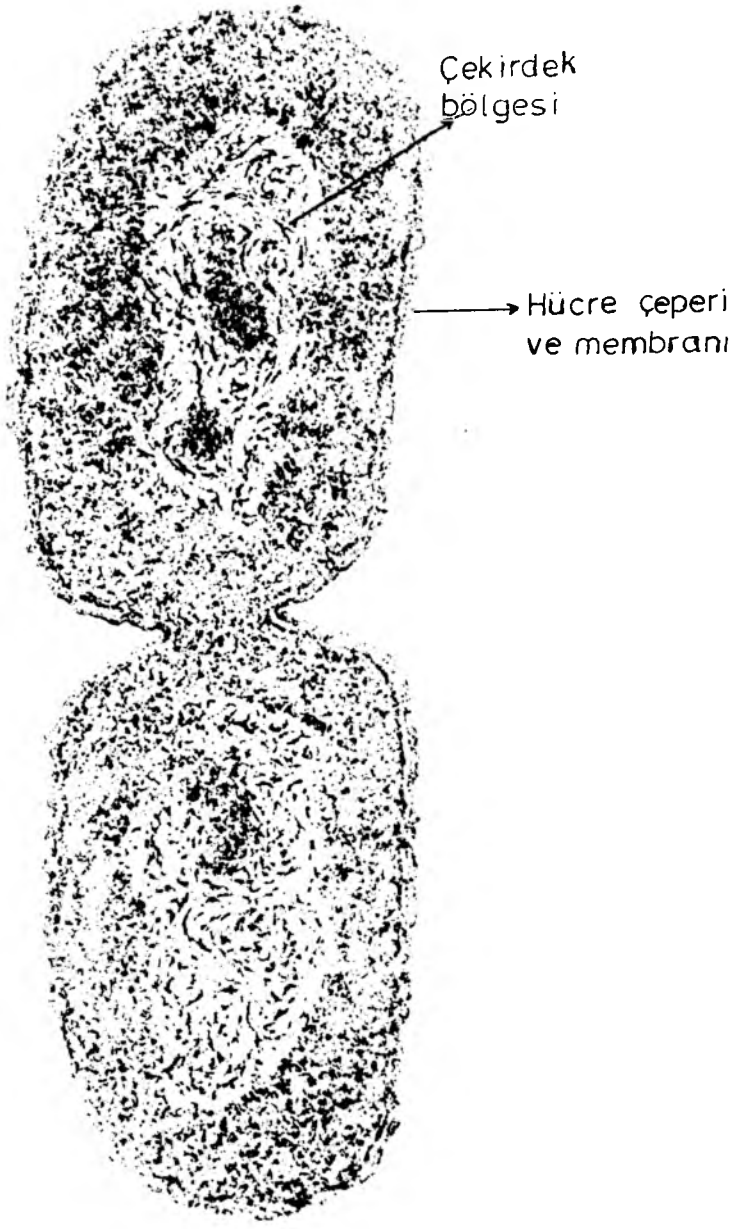
Tablo 2.3. Bazı biyomolekül ve hücre bileşenlerinin yaklaşık boyut ve ağırlıkları.

	Uzunlamasına boyut (A°)	Ağırlık (dalton)
Alanin	5	89
Glukoz	7	180
Fosfolipid	35	750
Miyoglobin (küçük bir protein)	36	16.900
Hemoglobin (orta büyüklükte bir protein)	68	65.000
Miyozin (büyük ve çubuk şekilli bir protein)	1.600	470.000
Glutamat dehidrogenaz (çok büyük globuler bir protein)	130	1.000.000
E.coli ribozomu	180	2.800.000
E.coli bakteriofajı X 174	250	6.200.000
Tütün mozaik virüsü	3.000	40.000.000
Mitokondri (karaciğer hücresi)	15.000	$1x10^{-12}$ g
E.coli hücresi	20.000	$2x10^{-12}$ g
Kloroplast (ıspanak yaprağı)	80.000	$1,3x10^{-10}$ g
Karaciğer hücresi	200.000	$2x10^{-9}$ g

vardır. Prokaryotların yeryüzünde ilk yaratılan canlılar olduğu zannedilmektedir (Şekil 2.2).

Hücre çeperi ve membranı: Hücre çeperi, polisakkaritlerin kısa peptid zincirleriyle çarpraz bağlanması ile teşekkül eden sağlam bir çatıdan ibarettir. Aradaki boşluklar lastiğimsi lipopolisakkaritlerle doldurulmuştur. Bazı bakterilerde tüy gibi uzantılar vardır. Bunlar hücre çeperinin uzantılarıdır. Membranların yaklaşık % 45'i lipid, % 55'i proteinlerden ibaret olup, lipid ikili tabakasının içine proteinler gömülü veya yapışık haldedir.

Hücre çeperi bakteriyi hipotonik ortamda şişmek ve patlamaktan korur. Gözenekli olup, küçük moleküllerin geçişine izin verir. Tüycüklerin bazılarının içleri boş olup, cinsi birleşme esnasında DNA'nın transferini sağlar-



Şekil 2.2. Prokaryotik hücrelerin yapısal organizasyonu.

lar. Membranlar ise, suyu geçiren birçok basit elektrolitleri geçirmeyen bir yapıdadır. Solunum, fosforilasyon ve hücre çeperi sentez enzimlerini de ihtiva ederler.

Çekirdek bölgesi: Çok sıkı bir yumak gibi sarılmış bir DNA çift sarmalından ibarettir. DNA'ya bağlı protein yoktur. DNA genetik bilginin taşıyıcısı olup, bölünme esnasında herbir zincir iki oğul DNA çift sarmalı oluşturur.

Ribozomlar: E.coli yaklaşık 15 bin ribozom ihtiva eder. Herbiri büyük ve küçük olmak üzere iki alt birimden ibaret olup, yaklaşık % 65 RNA ve % 35 proteinden meydana gelmiştir. Protein sentezinin gerçekleştiği organellerdir.

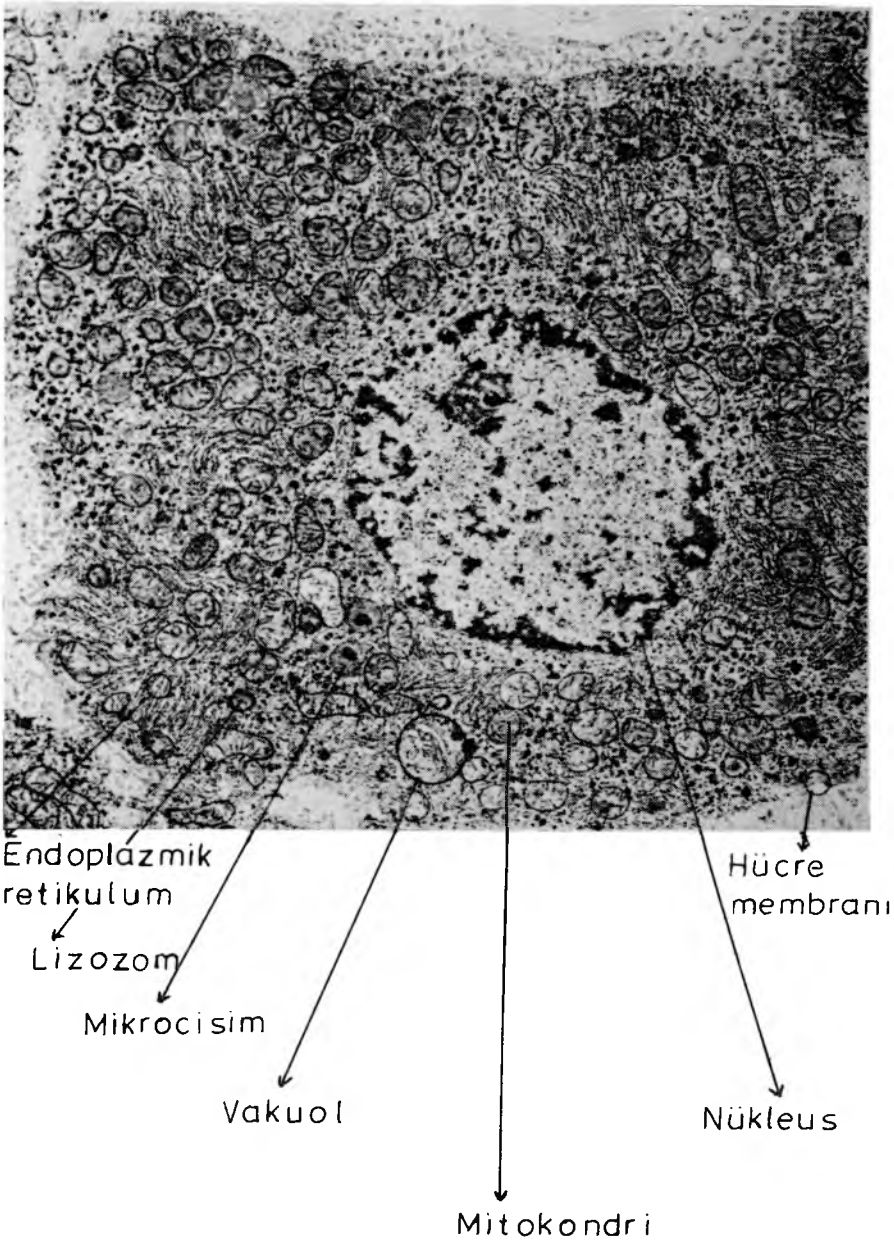
Depolama granülleri: E.coli granülleri glukozun bir polimeri olan granuloz ihtiva ederler. Diğer bazı bakterilerde ise poli-β-hidroksi butirik asit granülleri vardır. İhtiyaç anında granüller enzimatik olarak serbest glukoz veya β-hidroksibutirik aside parçalanırlar.

Sitozol: Sitozol nisbeten homojen ve viskoz bir çözelti olup, % 20'den fazla protein ihtiva eder. Sitozol, enzimler, metabolik ara bileşikler ve inorganik tuzlarca zengindir.

2.3.b. Ökaryotik Hücre Yapısı

Ökaryot hücreler, prokaryotlara nisbeten daha büyük ve daha komplekstirler. Hücre hacimleri prokaryotlardan 1000 ile 10000 misli daha fazladır. Hayvan ve bitki âlemindeki yüksek organizmaların hemen hemen bütün hücreleri ökaryotiktir. Aynı zamanda maya hücreleri, protozoalar ve birçok algler bu tip hücrelere sahiptir. Ökaryotlarda nükleus bir membranla sarılmıştır. Nükleer materyal ise, histon adı verilen proteinlere bağlı olan çok sayıda kromozomlardan ibarettir. Ökaryotlarda ayrıca membranlar tarafından çevrili mitokondriler, golgi cisimleri ve endoplazmik retikulum bulunur (Şekil 2.3).

Hücre kabuğu ve membranı: Hücre kabuğu, asidik mukopolisakkaritler, glikolipidler ve glikoproteinlerden ibarettir. Membran ise, bakterilere oranla daha çok çeşitte lipid ihtiva eder.



Şekil 2.3. Ökaryotik hücrelerin yapısal organizasyonu.

Hücre kabuğunun yapıştırma özelliği çok spesifik olup, hücrelerin birbirlerini tanımasında ve sonuç olarak organ teşekkülünde rol oynarlar. Plazma membranı ise, gerçek geçirgenlik engeli olup, önemli enzimleri, Na^+, K^+, glukoz, amino asitler ve diğer bileşikler için transport sistemlerini ihtiva eder.

Nükleus: Birçok gözeneklere sahip bir membranla çevrilidir. DNA, histon adı verilen proteinlerle birleşik olup, kromatinlerde kromozomları oluştururlar. Nükleolus bol miktarda RNA ihtiva eder. Mitoz esnasında koromozomlar, DNA'nın replikasyonu sonucunda oğul kromozomları oluştururlar. Nükleolusta ise RNA sentezlenir.

Mitokondriler: Yumurtamsı şekle sahip organellerdir. Hepatosit (karaciğer hücresi)'lerde yaklaşık 800 mitokondri vardır; sitoplazmik hacmin yaklaşık % 20'sini işgal ederler. Mitokondriler, iç ve dış membran olmak üzere iki membranla çevrilidir. Bu membranların lipid bileşimleri ve enzimatik aktiviteleri farklıdır. İç membranın içeriye doğru yaptığı katlanmalara krista ve mitokondri içi sıvısına matriks denir. Matriks ezimlerce zengin olup, bir DNA zinciri de ihtiva eder.

Mitokondriler glukozun, yağ asitlerinin CO_2 ve H_2O'-ya kadar moleküler oksijenin kullanılmasıyla oksitlendiği yerdir. Oksidatif fosforilasyon enzimleri iç membranda lokalize olmuşlardır.

Golgi cisimleri: Diktiosom adı da verilen bu organeller, birbiri üzerine istiflenmiş, yassı membranla çevrili veziküllerdir. Salgılanacak ürünlerin konsantre olduğu durumlarda vakuol şeklini alırlar.

Golgi cisimleri, protein gibi hücre ürünlerinin dışarıya salıverilmesini sağlarlar. Özellikle plazma ve lizozomal membran teşekkülünde aktiftirler.

Mikrocisimler: Peroksizomlar olarak da adlandırılan

bu organeller, katalaz, D-amino asit oksidaz ve diğer oksitleyici enzimleri ihtiva ederler. Tek membranlı, veziküllerdir. Hücre içi H_2O_2 metabolizmasını düzenlerler. Bitkilerde çimlenme esnasında yağların karbohidratlara çevrilmesini sağlarlar.

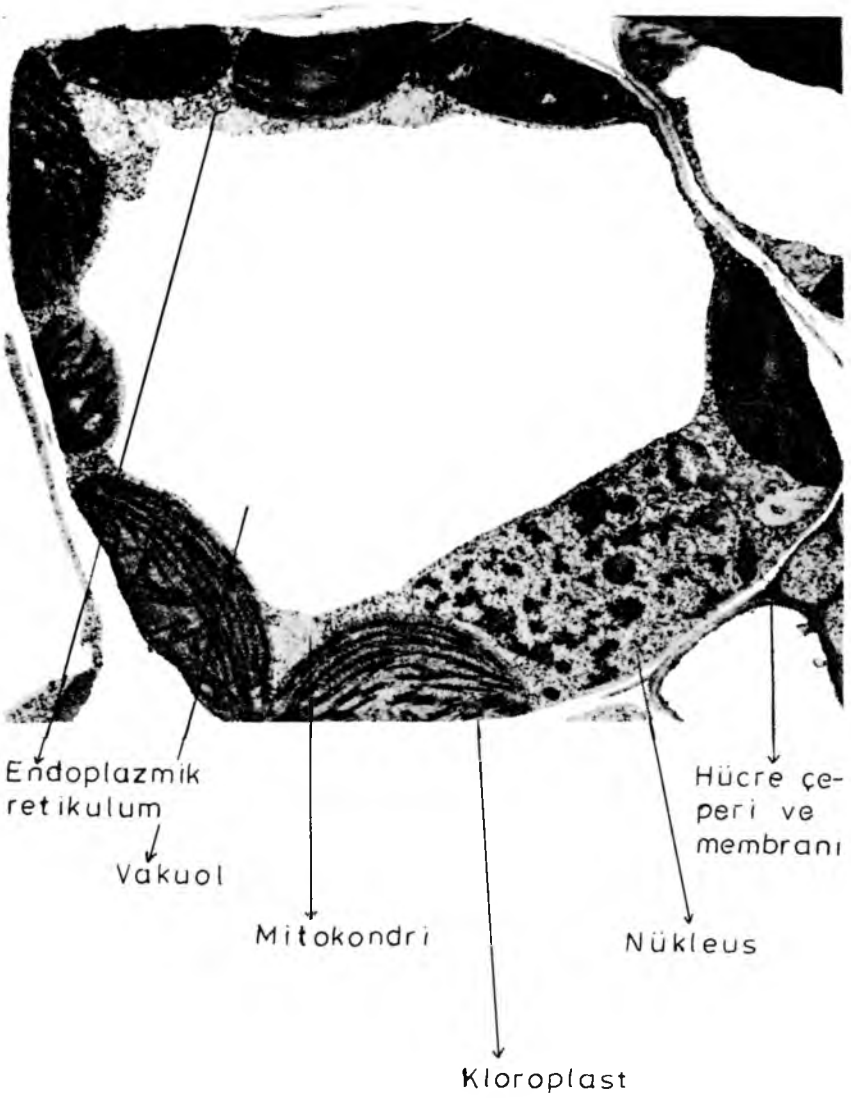
Lizozomlar: Tek membranlı veziküller olup, ribonükleazlar, proteazlar, fosfatazlar gibi hidrolitik enzimleri ihtiva ederler. Fagositoz veya pinositoz ile hücre içerisine sokulan materyallerin sindirilmesini sağlarlar.

Endoplazmik retikulum ve ribozomlar: Endoplazmik retikulum, cisternae adı verilen iç bölmelere sahip yassı veziküllerden ibarettir. Bu bölmeler sitoplazmanın içinden doğru birbirlerine kanallarla bağlıdır. Yüzeyleri ribozomlarla kaplıdır. Ökaryotik ribozomlar, prokaryotlardakinden daha büyüktür. Yüzeye yapışık olan ribozomlarda protein sentezlenir ve bu proteinler endoplazmik retikulum kanalları vasıtasıyla hücre periferine doğru taşınırlar.

2.3.c. Fotosentetik Hücreler

Yüksek bitkilerin yaprak mezofillerindeki parenkimal hücreler fotosentez yönünden oldukça aktiftirler. Bu hücreler hayvan hücrelerinde karşılaşılan nükleus, mitokondri, golgi cisimleri, endoplazmik retikulum ve ribozomlar gibi ökaryotik yapı ve organelleri ihtiva ettikleri gibi, farklı olarak da üç tane başka önemli yapılara da sahiptirler. Bunlar kloroplastlar, büyük vakuoller ile kalın ve sağlam hücre duvarlarıdır. Yeşil hücrelerin kloroplastları klorofilce zengin olup, CO_2 ve H_2O'dan glukoz sentezlenip, nişasta halinde depolanmaktadır. Fotosentez hücreleri karanlıkta atmosferik oksijeni kullanarak glukoz oksitlerler (Şekil 2.4).

Hücre çeperi: Bitki hücre çeperleri kalın ve sağlam olup, kutuya benzerler. Çeper, polisakkarit ve protein karışımı ile örtülmüş selüloz liflerinden ibarettir. Hüc-



Şekil 2.4. Yüksek bir bitkinin fotosentetik olarak aktif olan bir yaprak hücresinin yapısal organizasyonu.

re çeperi, membranı mekanik ve osmotik basınçlardan korur ve hücrenin pozisyonunu da tespit eder.

Hücre membranı: Kalınlık, yapı ve özellikleri bakımından hayvan hücrelerindekine benzer. Lipid bileşenleri ve aktif transport sistemleri ise oldukça farklıdır.

Nükleus: Nükleus, perinükleer membran ve nükleolus, hayvan hücrelerine benzer. Kromozom sayıları tabii olarak farklıdır.

Kloroplast: Yüksek bitkilerin hücreleri, membranla çevrili ve bazıları da DNA ihtiva eden, plastid adı verilen organellere sahiptirler. Bazı plastidler pigment ihtiva ederler (kromoplastlar), bazıları da etmezler (lökoplastlar). Klorofil ihtiva eden plastidler, kloroplast adını alır ve fotosentez aktivitesine sahiptirler. Diğer kromoplastlar karotenoid pigmentleri depolarlar. Lökoplastlar arasında nişasta granüllerini depolayan amiloplastlar sayılabilir.

Kloroplastlar, mitokondrilere oranla daha büyük olup (8 mikrondan büyük), bir hücrede birbirlerinden farklı şekillere sahip çok sayıda bulunabilirler. İç membranları disk şeklinde birbiri üzerinde istiflenmiş yassı veziküller teşkil ederler. Tilakoid adı verilen bu veziküllerin membranları, klorofil ve fotosentetik elektron taşıyıcı proteinlere sahiptirler. ATP, indirgeyici güç olarak NADPH ve oksijen kloroplastlarda meydana gelirken, CO_2 'nin indirgenmesi sonucu glukoz ve nişasta sentezi de burada oluşur.

Mitokondriler: Hepatositlere nisbeten daha az sayıda olup, kristaları daha seyrektir. Işık altında yaprak hücreleri enerji ihtiyaçlarının çoğunu kloroplastlardan sağlarlar. Karanlıkta ise mitokondrial solunum daha çoktur. Enzimatik ve yapısal düzenlenmesi hayvan hücrelerindekine benzer.

Vakuoller: Vakuoller, yarı geçirgen bir zarla çevrilidir. Genç hücrelerde küçük iken, yaşlandıkça büyürler. Vakuollerin içinde çözünmüş halde şekerler, organik asitler, proteinler, tuzlar, oksijen, CO_2 ve pigmentler mevcuttur. Vakuoller, hücrenin hayatı esnasında tedricen biriken ve yoğunlaşan artık ve çözünenlerin ayırdedilmesi görevini üstlenir. Çözünenler bazen vakuoller içinde kristallenir.

Endoplazmik retikulum: Endoplazmik retikuluma yapışmış olan ribozomlar, büyüklük ve bileşim yönünden hayvan hücrelerinden biraz farklıdır. Burada protein sentezi gerçekleştirilir ve sentezlenen proteinler, sitoplazma içinden doğru kanalize edilirler.

3.BÖLÜM: S U V E S U L U Ç Ö Z E L T İ L E R İ N Ö Z E L L İ K L E R İ

Su, canlı organizmanın en önemli ihtiyaçlarından birisidir. Oksijensiz yaşayabilen canlılar olabildiği halde, susuz ortamda bir hayat düşünülemez. Çünkü canlılığın devamı için meydana gelen bütün biyokimyasal olaylar sulu çözeltide cereyan etmektedir. Bir insan vücudunu göz önüne alırsak, yetişkinlerde vücut ağırlığının % 60'ını, yeni doğan çocuklarda % 75'ini su oluşturmaktadır. Deniz anaları gibi bazı yaratıklarda bu miktar % 98'e kadar yükselebilmektedir.

Su, organizmada anorganik ve organik maddeler için iyi bir çözücü olmasının yanısıra metabolik artıkların ve toksik maddelerin atılmaları için de iyi bir taşıyıcıdır.

Bu bölümde suyun canlılarda bu derece önemli olmasının fizikokimyasal esasları izah edildikten sonra, sulu çözeltilerle ilgili biyokimyaca önemli bazı tarifler verilecektir. Asitlik ve bazlık sulu çözeltilerin önemli özelliklerinden birisi olmanın yanısıra, biyomoleküllerin, özellikle bütün proteinlerin yapı ve aktivitelerini belirleyen çok mühim bir faktördür. Bu konu da tampon çözeltilerle birlikte ele alınacak ve bu bilgilerin ışığı altında insan vücudundaki asit-baz dengesi fazla ayrıntıya inilmeden izah edilecektir.

3.1. SU

Heryerde bulunduğundan dolayı su, canlı organizmalarda aktif olmayan, inert ve boşluk doldurucu bir madde olarak düşünülmektedir. Gerçekte su, oldukça reaktif bir bileşiktir. Fiziksel ve kimyasal özellikleri bilinen birçok sıvıdan farklıdır. Şimdi, suyun ve onun iyonlaşma ürünleri olan H^+ ve OH^- iyonlarının, proteinlerin, nükleik asitlerin, lipidlerin, membranların ve birçok diğer hücre bileşenlerinin yapı ve biyolojik özelliklerini

tayin eden faktörler olduğu bilinmektedir.

Bilinen diğer sıvılara kıyasen su, yüksek bir erime noktasına, kaynama sıcaklığına, buharlaşma ve erime ısısına, özgül ısıya ve yüzey gerilimine sahiptir. Bu özellikler su molekülleri arasında kuvvetli bir çekim olduğunu göstermektedir. Meselâ, Tablo 3.1'de suyun listedeki diğer sıvılara oranla daha yüksek erime, kaynama noktaları ve buharlaşma ısısına sahip olduğu görülmektedir.

Tablo 3.1. Bazı sıvıların erime ve kaynama noktaları ve buharlaşma ısıları (1,0 atm'de).

	E.n. (°C)	K.n. (°C)	Buh.ısısı (cal/gr)
Su	0	100	540
Metanol	-98	65	263
Etanol	-117	78	204
Propanol	-127	97	164
Aseton	-95	56	125
Hekzan	-98	69	101
Benzen	6	80	94
Kloroform	-63	61	59

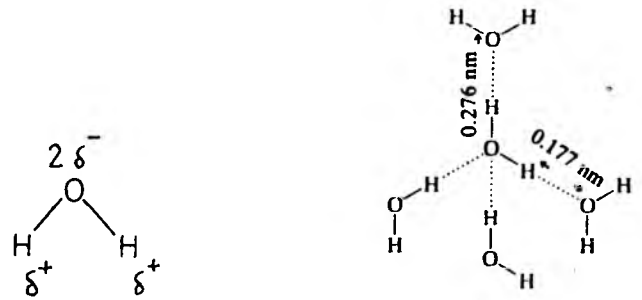
Buharlaşma ısısı, doğrudan doğruya bir sıvıdaki birbirine komşu moleküller arası çekim kuvvetlerini altetmek ve gaz fazına geçmek için gerekli olan enerji miktarını verir. Suyun hücre yapısında olmasa bile biosferde diğer sıvılara üstünlüğü, katı halinin hacminin daha fazla olması ve bunun sonucu yoğunluğunun az olarak suyun yüzeyinde kalmasıdır. Aksi halde hayattan bahsedilemezdi.

Su molekülleri arasındaki kuvvetli çekim, molekülün dipolar özelliğinden ileri gelmektedir. H_2O'da, oksijen atomunun yarı doymuş iki sp^3 hibrid orbitali ile iki hidrojen atomunun 1s orbitallerinin üstüste gelmesi sonucu aralarında 104,5°'lik bir açı ile H-O-H bağları teşekkül eder. Oksijen hidrojene oranla daha elektronegatif bir atom olduğundan paylaşılan elektron çifti oksijene daha yakın durur ve oluşan bağda simetrik olmayan bir elektron

dağılımı sonucu bir yük kutuplaşması meydana gelir. Şekil 3.1.a'da görüldüğü gibi, oksijen atomu üzerinde negatif yük (δ^+ ile gösterilir), hidrojen atomları üzerinde pozitif yük (δ^- ile gösterilir) teşekkül eder.

3.2. HİDROJEN BAĞI

Su molekülünün dipolar yapısı su molekülleri arasındaki çekim kuvvetlerinden büyük ölçüde sorumludur. Çünkü bir su molekülünün oksijen atomu üzerindeki kısmı negatif yük ile bir diğer komşu su molekülünün hidrojen atomu üzerindeki kısmi pozitif yük arasında kuvvetli bir elektrostatik çekim hasıl olur. Bu tip elektrostatik etkileşmeye hidrojen bağı adı verilir. Oksijen çevresinde elektronların yaklaşık bir tetrahedral konfigürasyonunda dizilmesinden dolayı, herbir su molekülünün dört komşu su molekülü ile hidrojen bağı yapma eğilimi vardır (Şekil 3.1.b).

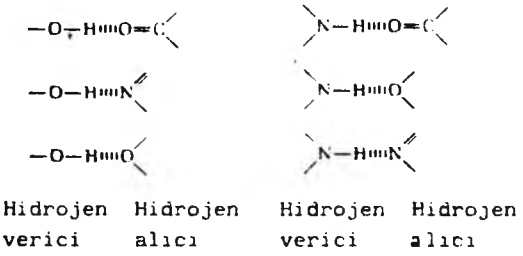


(a) (b)

Şekil 3.1. a) Su molekülü üzerindeki yük dağılımı ve **b)** Buz kristalinde su moleküllerinin tetrahedral dizilişi.

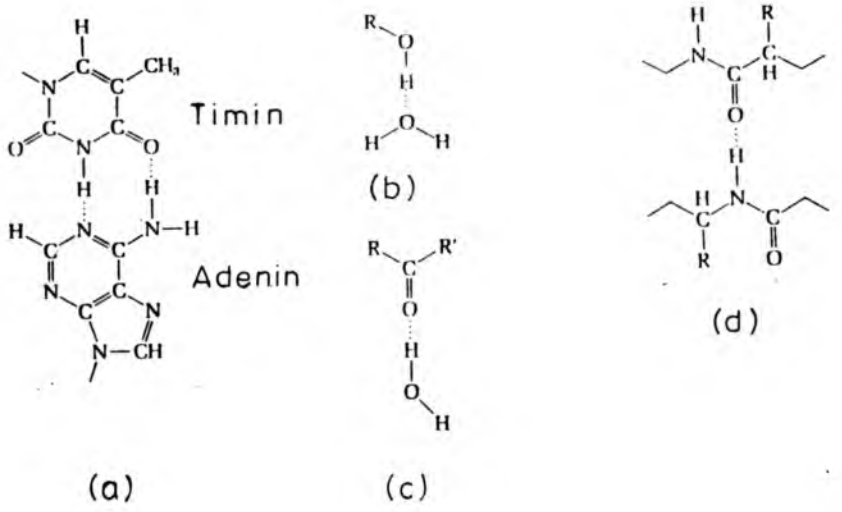
Hidrojen bağının oluşumunda iki unsur vardır: 1-Hidrojen alıcı, 2-Hidrojen verici. Hidrojen alıcı bağ yapmamış elektron çiftine sahip olan elektronegatif bir atomdur. Hidrojen verici ise, hidrojen atomunun kovalent bağlı olduğu bir başka elektronegatif atomdur. Şekil 3.2'de biyomoleküllerde sık rastlanan hidrojen alıcı ve verici gruplar arasında meydana gelen hidrojen bağları görülmektedir. Oksijen ve azot burada elektronegatif atomlar olarak görev almaktadır.

Hidrojen bağları kovalent bağlara oranla zayıftır. Su molekülleri arasındaki hidrojen bağının ortalama bağ enerjisi 4,5 kcal/mol iken, O-H kovalent bağı için bu değer 110 kcal/mol'dür. Hidrojen bağı ile birbirine bağlanan iki elektronegatif atom arasındaki mesafe de 2,6 A° ile 3,1 A° arasında değişmektedir.



Şekil 3.2. Hidrojen bağının bazı hidrojen alıcı ve verici gruplar arasında oluşumu.

Hidrojen bağları iki molekül arasında olabileceği gibi, proteinler gibi makromoleküllerde bulunan çok sayıda gruplar arasında da gerçekleşebilir. Şekil 3.3'te biyomoleküllerde rastlanan hidrojen bağlarına çeşitli örnekler verilmiştir.



Şekil 3.3. Biyolojik önemi olan bazı hidrojen bağları: **(a)** DNA'da komplamenter baz çiftleri arasında, **(b)** Bir hidroksil grubu ile H_2O arasında, **(c)** Bir karbonil grubu ile H_2O arasında ve **(d)** İki peptid zinciri arasında.

Sulu çözeltilerde iki çözünen molekülü arasında bulunan tekli hidrojen bağları oldukça zayıftır. Çünkü, ortamdaki su molekülleri aynı bağı yapmak üzere bu moleküllerle yarış halindedir. Ancak, her iki molekül arasında çok sayıda hidrojen bağı mevcutsa, bunları ayırmak için gerekli enerji su moleküllerinin aynı noktalardan oluşturacakları hidrojen bağlarının toplam enerjilerinden çok daha büyük olacaktır. Bu olaya kooperatif hidrojen bağları adı verilir ve proteinler ile nükleik asitlerde oluşan düzinelerce ve hatta yüzlerce hidrojen bağları buna örnek gösterilebilir.

Hidrojen bağlarının yönelme durumları, kuvvetlerini önemli ölçüde etkilemektedir. Verici atom, hidrojen ve alıcı atom aynı doğrultuda olduğu zaman en kuvvetli hidrojen bağı meydana gelir. Eğer alıcı atom verici atomla hidrojeni birleştiren bağla bir açı yapıyorsa, bağ kuvveti artan açı ile azalır (Şekil 3.4).

Şekil 3.4. Hidrojen bağlarının yönelme durumları.

Hidrojen bağının zayıf olması biyomoleküller için kinetik bir avantaj sağlamaktadır. Özellikle proteinlerin biyolojik aktivitelerini gösterirken, üç boyutlu yapılarında bazı değişmeler olmaktadır. Dolayısıyla rijid bir yapıdan ziyade esnek karakterde olmaları, kolayca oluşup parçalanabilen bağların varlığına bağlıdır. Hidrojen bağları bu özelliği temin edebilmektedir. Çünkü bu bağların yarılanma süreleri 10^{-9} -10^{-11} saniyedir.

3.3.SUYUN ÇÖZÜCÜ ÖZELLİĞİ

Dipolar tabiatının bir sonucu olarak su, birçok bileşikleri çözer ve dağıtır. Bilinen diğer sıvılardan çok daha iyi bir çözücüdür.

Birçok kristal haldeki tuzlar ve diğer iyonik bileşikler kloroform ve benzer gibi apolar çözücülerde çözünmez iken su içinde kolaylıkla çözünürler. NaCl gibi tuzların kristal örgüsü, pozitif ve negatif yüklü iyonlar arasındaki çok kuvvetli elektrostatik kuvvetler etkisiyle meydana geldiğinden, bu iyonları birbirlerinden ayırmak için önemli miktarda enerji gerekmektedir. Bununla beraber, çevresi su molekülleriyle çevrilmiş (yani hidratlanmış) kararlı Na^+ ve Cl^- iyonları oluşturmak üzere, su moleküllerinin kutuplarıyla Na^+ ve Cl^- iyonları arasında meydana gelen kuvvetli elektrostatik çekim, Na^+ ve Cl^- iyonlarının birbirlerini çekme eğilimine üstün gelir.

Suda kolayca çözünen ikinci tip maddeler de iyonik

olmayan şekerler, basit alkoller, aldehitler ve ketonlar gibi polar bileşiklerdir. Bunlar su molekülleriyle fonksiyonel polar grupları vasıtasıyla hidrojen bağları oluştururlar.

3.4. SULU ÇÖZELTİLER

Canlı organizmalardaki tüm kimyasal olaylar sulu ortamda cereyan eder. Hücre içi sıvısında proteinler, organik bileşikler, anorganik anyon ve katyonlar çözünmüş haldedirler. Ekstraselüler sıvı denilen kan ve omurilik sıvısı gibi hücre dışı sıvılarında da durum böyledir. Her iki sıvı arasındaki geçişler ve her birisindeki kimyasal etkileşmeler, çözeltilerde geçerli olan fizikokimyasal prensiplere göre vuku bulur. Şimdi bu prensipleri daha iyi anlamak için sulu çözeltilerle ilgili bazı kavramları izah edeceğiz.

3.4.a. Çözünürlük

Herhangi bir maddenin sabit sıcaklıkta, belirli bir hacim çözücüde, meselâ 1000 ml. suda, çözünen maksimum miktarına o maddenin çözünürlüğü denir. Birçok katı ve sıvıların çözünürlüğü sıcaklıkla artarken, gazlarınki de bunun tersine azalır. Gazların çözünürlüğü sıcaklığın yanısıra o gazın suyun üzerindeki kısmi basıncına da bağlıdır. Bir maddenin bir çözücü içinde maksimum miktarda çözünmüş haline doygun çözelti adı verilir. Doygunluktan fazla miktarda katı madde dibe çöker, sıvı madde ayrı bir faz oluşturur, gaz ise kabarcıklar halinde yüzeye çıkar.

3.4.b. Koligatif Özellikler

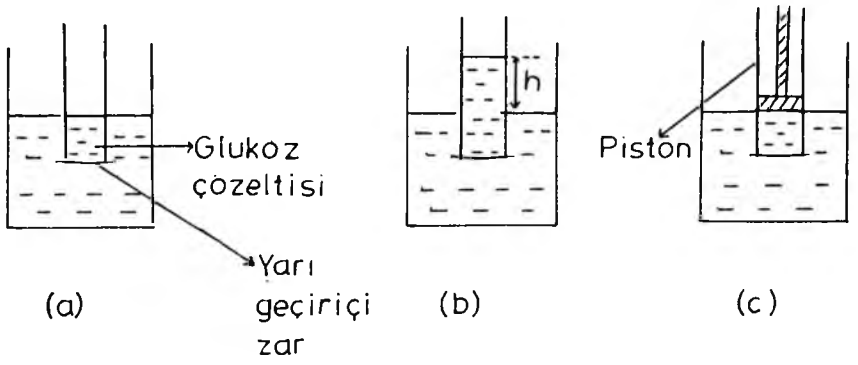
Çözünen moleküller çözücünün bazı fizikokimyasal özelliklerinde değişiklik meydana getirirler. Bu değişikliğin miktarı çözünen maddelerin cinsine değil, doğrudan çözünen tanecik sayısına bağlıdır. Bunlara koligatif özellikler denir ve dört tanedir: 1-Buhar basıncı alçalması, 2-Kaynama noktası yükselmesi, 3-Donma noktası al-

çalması, 4-Osmotik basınç. Özellikle makromoleküllerin molekül ağırlığı tayininde koligatif özelliklerden yararlanılır. Bunlardan osmotik basınç ve osmoz olayı, biyolojik sistemlerde çok önemli olduğundan üzerinde ayrıca duracağız.

3.4.c. Osmotik Basınç

Yarı geçirgen (semi-permeable) bir zardan sadece su moleküllerinin geçmesine osmoz olayı denir. Yarı geçirgen bir zarın bir tarafında su, diğer tarafında bir çözelti bulunsun. Su molekülleri ve çözünmüş tanecikler termik hareketleri dolayısıyla zara çarparlar. Su molekülleri zardan kolayca geçtikleri halde çözünmüş tanecikler, özellikle makromoleküller hiç geçemezler. İşte bu geçemeyen taneciklerin zarı su tarafına itmeleriyle oluşan basınca osmotik basınç denir. Çözünmüş taneciklerin çözelti içinde yaptıkları kinetik basınçtan ibaret olan osmotik basınç, çözeltinin konsantrasyonu ve sıcaklıkla doğru orantılıdır. Osmotik basıncın mahiyetini Şekil 3.5'den daha iyi anlıyabiliriz. Burada dibi yalnız suyu geçiren yarı geçirgen bir zarla kapatılmış bir tüpün içerisine bir miktar glukoz çözeltisi konulmuş ve bu tüp, içinde saf su olan bir kaba sıvı yüzeyleri aynı seviyede olmak üzere batırılmıştır. Bir süre sonra tüp içindeki sıvı seviyesinin suyunkinden yukarıya çıktığı gözlenir. Çünkü su, konsantrasyonunun az olduğu glukoz çözeltisine geçerken, glukoz dışarıya çıkamıyacaktır. Suyun bu geçişi, sıvı yüzey seviyelerinin yükseklik farkından ileri gelen hidrostatik basıncın osmotik basınca eşit olmasına kadar devam eder. Bir başka ifade ile, bu geçişe çözelti yüzeyine osmatik basınç kadar bir ilâve basınçla etki edilmesi sonucu engel olunabilir.

Organizmanın hücre içi ve hücre dışı sıvılarının osmotik basıncına eşit bir osmotik basınca sahip çözeltilere izotonik çözeltiler denir. Konsantrasyonu izotonik çözeltininkinden daha az olanlara hipotonik, daha çok olanlara da hipertonik çözeltiler adı verilir. İzotonik



Şekil 3.5. Osmoz olayı ve osmotik basınç: **(a)** Başlangıçta seviyeler eşit, **(b)** Su çözeltiye geçer. Denge halinde çözelti yüksekliğine tekabül eden hidrostatik basınç osmotik basınca eşittir, **(c)** Çözeltiye suyun osmotik geçişini önleme, ancak pistona osmotik basınç kadar bir kuvvet uygulamakla mümkündür.

çözelti içine konan hücrelerde (meselâ eritrositlerde) hiçbir değişiklik olmaz. Hipotonik ortamda ise, hücre içine su girer, hücreyi şişirir ve hatta patlatır. Eritrositlerin söz konusu parçalanmalarına ve bunun sonucu olarak hücre içi sıvısının çözeltiye karışması olayına hemoliz olayı adı verilir. Hipertonik çözeltilerde ise hücreler büzülmeye uğrarlar.

İnsan hücre içi veya hücre dışı sıvılarının osmotik basıncı % 0,9'luk NaCl, % 3,8'lik sodyum sitrat ve % 4,8'lik glukoz çözeltileriyle aynıdır. Hastalara takılan ve serum adı verilen çözeltiler vücut sıvılarıyla izotoniktir.

3.4.d. Difüzyon

Denge halindeki bir çözeltide çözünen moleküller devamlı hareket halindedirler ve birim zamandaki toplam yer değiştirme miktarları sıfırdır. Çünkü çözünen içinde

homojen bir dağılımları vardır. Bununla beraber çözelti içerisinde bir konsantrasyon dağılımı farklılığı (konsantrasyon gradienti) söz konusu ise, çözünen moleküller çözelti konsantrasyonunu her tarafta aynı kılacak yönde bir hareket yapacaklardır. Meselâ, bir protein çözeltisi üzerine dikkatlice bir su tabakası ilâve edersek, protein molekülleri konsantrasyonlarının yüksek olduğu alt tabakadan, düşük olduğu su tabakasına hareket edecekler ve bu hareketleri her iki tabakadaki protein konsantrasyonu eşitleninceye kadar devam edecektir. İşte, bu konsantrasyon gradientine karşı protein moleküllerinin hareketine difüzyon adı verilir. Difüzyon sonucu çözünen moleküller çözelti içinde azami dağınıklığı kazanmış olurlar. Bu da termodinamiğin ikinci kanununun, yani sistemlerin entropilerini devamlı artırma eğilimlerinin bir neticesidir.

3.5. SUYUN ÖZ İYONLAŞMASI

Sudaki hidrojen, küçük olması ve elektronunun oksijen atomu tarafından sıkıca tutulmasından dolayı, kovalent olarak bağlandığı oksijenden ayrışarak komşu su molekülünün oksijen atomuna hidrojen bağıyla bağlanır. Bu reaksiyon sonucu iki iyon teşekkül eder: hidronyum (H_3O^+) ve hidroksil (OH^-) iyonları. Yapılan iletkenlik ölçümleri sonucu 25°C'da bir litre saf suda herhangi bir anda $1x10^{-7}$ mol H_3O^+ iyonu ve eşit miktarda OH^- iyonu bulunduğu gösterilmiştir. Suyun öz iyonlaşması adını verdiğimiz bu olayı basitçe

$$H_2O \rightleftharpoons OH^- + H^+$$

reaksiyonuyla gösterebiliriz. Ancak hidrojen iyonu su içinde H_3O^+ halinde bulunur ve bu iyon da üç su molekülü ile $H_9O_4^+$ iyonu oluşturacak şekilde hidrojen bağı yapar.

Suyun $H_2O \rightleftharpoons OH^- + H^+$ reaksiyonuna göre iyonlarına ayrışması bir denge olayıdır ve ayrışma denge sabiti

$$K' = \frac{[H^+][OH^-]}{[H_2O]}$$

şeklinde yazılır. Burada köşeli parantezler litrede mol olarak konsantrasyonları göstermektedir. Bu denge sabitinin büyüklüğü saf suda yapılan iletkenlik ölçümleriyle elde edilebilir.

Saf sudaki H_2O konsantrasyonu çok büyük (1000/18= 55,5 M) ve H^+ ile OH^- iyonları konsantrasyonları çok düşük (25°C'da $1x10^{-7}$ M) olduğundan, öz iyonlaşmadan dolayı suyun konsantrasyonunun değişmeyip sabit kaldığı kabul edilebilir. Buradan $55,5xK' = [H^+][OH^-]$ eşitliğindeki sol taraf tek bir K sabitinde toplanarak $K=[H^+][OH^-]$ elde edilir. K sabitine suyun iyon çarpımı adı verilir ve K_{su} ile gösterilir. K_{su}'yun 25°C'daki değeri $1x10^{-14}$ 'dür. Asidik bir çözeltide H^+ konsantrasyonu nisbeten yüksek, OH^- konsantrasyonu ise düşüktür. Bazik bir çözeltide bunun tersi olur.

K_{su}, asitliği 1,0 M H^+ ve 1,0 M OH^- arasındaki sulu çözeltilerde, H^+ veya OH^- seviyelerinin bir ölçeği olan pH'nın bulunmasında temel olarak alınır. pH, hidrojen iyonu konsantrasyonunun eksi logaritmasıdır:

$$pH = - \log [H^+]$$

25°C'da tam nötr çözeltilerde $[H^+] = [OH^-] = 1x10^{-7}$ M'dır. Bu çözeltinin pH'sı da pH= $-\log 1x10^{-7}$ =7,0'dır.

pH'ya benzer şekilde pOH ve pK_a terimleri de biyokimyada sık sık kullanılmaktadır. Burada pOH, OH^- iyonu konsantrasyonunun eksi logaritmasını gösterirken, pK_a da bir bileşikten H^+ ayrışması denge sabitinin eksi logaritmasını ifade etmektedir. Bütün sulu çözeltilerde 25°C'da pH+pOH=14'dür. Bazı sıvıların pH'sı Tablo 3.2'de verilmiştir.

Biyokimya laboratuvarlarında pH ölçümü, en çok yapılan işlemlerden birisidir. Bu maksatla pH-metre adı verilen ve hidrojen iyonuna hassas cam elektrodların bulunduğu cihazlardan faydalanılmaktadır. Daha kaba pH tayinleri için de indikatör ihtiva eden kâğıtlar kullanılmaktadır.

Tablo 3.2. Bazı sıvıların pH'sı.

	pH		pH
Deniz suyu	7,0-7,5	Pankreas salgısı	7,8-8,0
Kan	7,4	Tükrük	6,3-6,8
Ekstraselüler sıvı	7,4	Sığır sütü	6,6
İntraselüler sıvı		İdrar	5,0-8,0
Kas	6,1	Domates suyu	4,3
Karaciğer	6,9	Üzüm suyu	3,2
Mide özsuyu	1,2-3,0	Kolalı meşrubat	2,8
		Limon suyu	2,3

3.6. ASİTLİK VE BAZLIK

Sulu çözeltilerde olduğu gibi susuz çözeltilerde de uygulanabilen en geniş kapsamlı asit-baz tarifi G.N. Lewis tarafından yapılmıştır. Lewis'e göre bir elektron çifti kabul edebilen asit, verebilen de bazdır. Lewis tarifleri organik ve biyokimyasal reaksiyon mekanizmalarının incelenmesinde faydalı olmaktır. Ancak seyreltik sulu çözeltilerde J.N. Brönsted ve T.M.Lowry tarafından geliştirilen tarif daha çok kullanılmaktadır. Brönsted ve Lowry'ye göre proton veren asit ve proton alan bazdır. Bir asit-baz reaksiyonu daima bir eşlenik asit-baz çifti ihtiva eder. Meselâ, asetik asit (CH_3COOH) ve asetat anyonu (CH_3COO^-) bir eşlenik asit-baz çifti oluştururlar. Asitlerin protonlarına karşı farklı derecelerde ilgileri (afiniteleri) vardır. Protonlarına ilgisi yüksek olan asitler zayıf olup çok az ayrışırlar. Kuvvetli asitlerin ise protonlarına ilgisi azdır ve H^+ iyonlarını kolayca verebilirler. Bazı asitlerin proton verme reaksiyonlarıyla beraber eşlenik bazları Tablo 3.3'te verilmiştir.

Aşağıda sıralanan asitlerden yalnız HCl kuvvetli asittir ve % 100 iyonlaşır. Diğerleri ise kısmen ayrışırlar ve zayıf asittirler. Ayrışma olayı bir denge reaksiyonundan ibarettir. Zayıf asidi HA ile gösterirsek

$$HA \rightleftharpoons H^+ + A^-$$

denge reaksiyonun sabiti

Tablo 3.3. Bazı asitlerin iyonlaşma denge reaksiyonları.

Asitler		Eşlenik bazları		
HCl	$\rightleftharpoons$	Cl^-	+	H^+
H_2CO_3	$\rightleftharpoons$	HCO_3^-	+	H^+
HCO_3^-	$\rightleftharpoons$	CO_3^{-2}	+	H^+
H_3PO_4	$\rightleftharpoons$	$H_2PO_4^-$	+	H^+
$H_2PO_4^-$	$\rightleftharpoons$	HPO_4^{-2}	+	H^+
NH_4^+	$\rightleftharpoons$	NH_3	+	H^+
RNH_3^+	$\rightleftharpoons$	RNH_2	+	H^+
HOH	$\rightleftharpoons$	OH^-	+	H^+
H_3O^+	$\rightleftharpoons$	H_2O	+	H^+

$$K_a = \frac{[H^+][A^-]}{[HA]}$$

ile verilir ve sıcaklıkla değişir. Eğer $[H^+]$'yı çekersek,

$$[H^+] = K_a \times \frac{[HA]}{[A^-]}$$

elde edilir. Her iki tarafın eksi logaritmasını alırsak,

$$-\log [H^+] = -\log K_a - \log \frac{[HA]}{[A^-]}$$

çıkar. Burada $pH = -\log [H^+]$ ve $pK = -\log K_a$ yerine koyulur ve $[HA]/[A^-]$ terimi ters çevrilirse, Henderson-Hasselbalch eşitliği adı verilen

$$pH = pK_a + \log \frac{[A^-]}{[HA]}$$

elde edilir. Bu eşitliği daha genel haliyle,

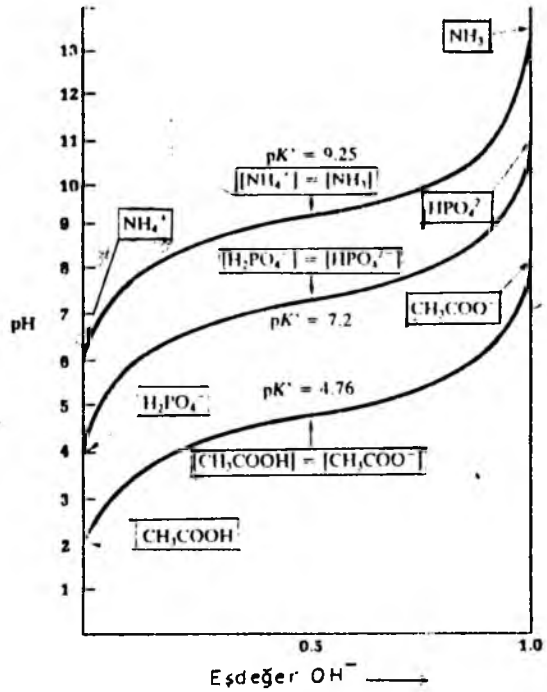
$$pH = pK_a + \log \frac{[\text{proton alıcı}]}{[\text{proton verici}]}$$

veya

$$pH = pK_a + \log \frac{[\text{tuz}]}{[\text{asit}]}$$

şeklinde yazabiliriz.

Bu eşitliklerin pratikteki anlam ve önemini kavramak için bazı zayıf asitlerin titrasyon eğrilerini incelemek gerekir. Şekil 3.6 bazı asit-baz eşlenik çiftlerinin, yalnız asit hallerinin bulunduğu pH'dan itibaren NaOH ilâvesiyle titrasyonları esnasında pH'daki değişmeleri göstermektedir. Herbir zayıf asidin titrasyon eğrilerinin şekilleri birbirine benzer, fakat her eğri farklı pH'larda yer almaktadır. 0,5 eşdeğer NaOH ilâvesindeki pH değeri sayısal olarak o asidin pK 'sına eşittir. Çünkü bu noktada zayıf asidin konsantrasyonu eşlenik bazının, bir başka ifade ile tuzunun konsantrasyonuna eşittir. Bu durumda $[tuz] / [asit]$ oranı 1 olacağından Henderson-Hasselbalch eşitliğindeki bu oranın logaritması sıfır değerini alır ve sonuçta $pH=pK_a$ olur.



Şekil 3.6. Bazı asitlerin başlıca iyonlarını pH'ya göre gösteren asit-baz titrasyon eğrileri.

Titrasyon eğrilerinde müşahede edilen bir diğer nokta da zayıf asidin eşlenik bazıyla, yani tuzuyla, beraber bulunduğu zaman kuvvetli bir baz olan NaOH'ın ilâvesi pH'yı çok az değiştirmektedir. Bir başka ifadeyle bu durum kuvvetli asit ve bazların pH üzerindeki etkisini tamponlamaktadır. İşte bir zayıf asidin eşlenik bazıyla veya bir zayıf bazın eşlenik asidi ile bir arada bulunduğu çözeltilere tampon çözelti (buffer solution) denilmektedir. Şekil 3.6'da görüldüğü gibi pH değişimi pK_a değeri civarında, yani $[tuz]/[asit] = 1,0$ durumunda minimumdur. Yani bir tampon çözeltinin tamponlama kapasitesi $pH=pK_a$ noktasında maksimumdur.

Canlı organizmaların hücre içi ve hücre dışı sıvıları, bunların normal pH'larında tampon görevi yapan eşlenik asit-baz çiftleri ihtiva ederler. En önemli hücre içi tamponu, $[H_2PO_4^-]/[HPO_4^{-2}]$ eşlenik asit-baz sistemidir ($pK_a=7,2$). Glukoz-6-fosfat ve ATP gibi organik fosfatlar ile iyonlaşabilir gruplar taşıyan proteinler de önemli hücre içi tamponları teşkil ederler. Eritrositlerdeki (alyuvarlar) tamponlamadan, hemoglobin ve oksihemoglobin sorumludur. Omurgalıların kan ve hücreler arası sıvısındaki en önemli tampon bikarbonat tampon sistemidir. Kandaki olağanüstü tamponlama etkisini kavramak için izotonik bir NaCl çözeltisinin (0,15 M NaCl) ve kanın birer litresine birer ml 10 M HCl ilâve edip, pH'larını ölçersek, çözeltinin pH'sının 7,0'dan 2,0'a, kanın pH'sının ise 7,4'den 7,2'ye düştüğünü görürüz. Vücut sıvılarında sözü geçen tampon sistemleri mevcut olmasaydı canlılık devam edemezdi. Çünkü dışarıdan alınan gıda maddelerinde bulunan asitli bileşikler ve metabolizma olayları sonucu oluşan organik asitler ve CO_2, pH'yı çok düşüreceklerdi. Enzim adı verilen protein yapısındaki biyokatalizörlerin aktivitesi pH'ya çok bağlı olduğundan metabolizma olayları felce uğrayacaktı.

Biyokimya laboratuvarlarında tampon çözeltiler çok sık kullanılır. Çalışılacak ortama uygun bir tampon sistemi, pK_a değerleri gözönüne alınarak seçilir. Tamponlama

kapasitesi yüksek olması için çalışılan pH'ya yakın pK_a değerine sahip eşlenik asit-baz çiftleri kullanılır. Böyle bir çözeltinin nasıl hazırlandığını bir örnekle gösterelim.

Örnek: pH'sı 5,0 olan 1 litre 0,1 M'lık asetat tamponunu nasıl hazırlarsınız? Asetik asit için pK_a = 4,74'dür.

$$pH = pK_a + \log \frac{[\text{asetat}]}{[\text{aset.asit}]}$$

Tampon çözelti 0,1 M'lık olacağına göre,

$$5,0 = 4,74 + \log \frac{x}{0,1-x}$$

denklemini yazabiliriz.

$$\log \frac{x}{0,1-x} = 0,26$$

$$\frac{x}{0,1-x} = 1,82$$

$$x = 0,0645 \text{ mol/lt}$$

o halde 0,0645 mol sodyum asetat, 0,0355 mol asetik asit bir kaba konur ve bir litreye saf su ile tamamlanır.

4.BÖLÜM: P R O T E İ N L E R

Proteinler bütün canlı varlıkların en önemli ve hücrelerin de en bol bulunan organik bileşikleridir. Bütün biyolojik olaylarda hayati görevleri vardır. Yapıları hakkında bilgi vermeden önce farklı biyolojik fonksiyonlarından en önemlilerini şöyle sıralayabiliriz:

Enzimatik katalizleme: Biyolojik sistemlerdeki kimyasal reaksiyonların hemen hemen tamamı enzim adı verilen spesifik makromoleküller tarafından katalizlenmektedir. Bu reaksiyonlardan bazıları, CO_2'nin su ile birleşmesi gibi oldukça basit olmasının yanısıra bazıları da meselâ bir kromozomun tamamının eşleşmesi (replikasyon) gibi son derece karmaşıktır. Enzimlerin olağanüstü bir katalizleme gücü vardır. Bugün 2000 civarında enzim karakterize edilmiş olup, hepsinin de protein yapısında olduğu ortaya konulmuştur. Böylece canlı sistemlerdeki kimyasal dönüşümlerin tamamına yakınının proteinlerce sağlandığı açık bir gerçek olmaktadır.

Taşıma ve depolama: Birçok küçük molekül ve iyonlar spesifik proteinler tarafından taşınmaktadır. Meselâ kanda oksijenin transportu hemoglobinle gerçekleşirken, aynı fonksiyon kaslarda miyoglobin tarafından görülmektedir. Demir kanda transferrin proteini tarafından taşınırken, yine karaciğerde transferritin adı verilen bir başka proteinle kompleks oluşturarak depolanır.

Mekanik hareket: Proteinler, kasların en başta gelen bileşenidir. Kas kasılması iki çeşit lif yapısındaki proteinlerin kayma hareketiyle ortaya çıkmaktadır. Mitoz olayında kromozomların hareketi de bir takım proteinlerin sayesinde olmaktadır.

Mekanik destek: Deri ve kemik dokularının gerilmeğe dayanıklılığı, fibröz bir protein olan kollagenin varlığıyla ortaya çıkmaktadır.

Bağışıklık: Antikorlar, vücuttaki virüs, bakteri ve diğer organizma hücreleri gibi yabancı maddeleri tanıyan ve onlarla birleşen çok spesifik proteinlerdir. Böylece proteinlerin organizmaya ait olanla olmayanları birbirinden ayırdetmede en önemli rolü oynadığı görülür.

Sinir uyarılarının üretimi ve iletimi: Spesifik uyarılara karşı sinir hücrelerinin cevabı reseptör (alıcı) proteinler aracılığı ile olmaktadır. Meselâ, rodopsin, retinal çubuk hücrelerinin fotoreseptör (ışık algılayıcı) proteinidir. Sinir hücrelerinde uyarıları iletme görevini üstlenen reseptör molekülleri de protein yapısındadır.

Hormonlar: Metabolizma olaylarının koordineli biçimde yürümesini sağlayan hormonların büyük bölümü protein yapısındadır. Bunun yanısıra bütün hormonlar, hücre membranları üzerinde proteinlerden ibaret reseptör moleküller tarafından tutulurlar.

Büyüme ve farklılaşmanın kontrolü: Hücre çekirdeğindeki genetik bilginin kontrollü ve sıra ile ifadesi gerekir. Herhangi bir anda hücre genomunun çok az bir kısmı ifade edilir. Bakterilerde represör (baskılayıcı) proteinler, hücre DNA'sının spesifik bölgelerinin ifade edilmeden kalmasını sağlayan kontrol molekülleridir.

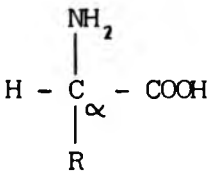
Proteinler, molekül ağırlıkları 5-10 binden birkaç milyona kadar değişen büyük moleküllerdir. Bazı proteinlerin molekül ağırlıklarını örnek olarak verirsek: insulin, 5500; ribonükleaz, 13.700; tripsin, 23.800; hemoglobin, 68.000; fibrinojen, 450.000; tiroglobin, 630.000 ve virüsler birkaç milyon olduğu gözlenir.

Proteinlerin % 50'si karbon, % 7'si hidrojen, % 23'ü oksijen, % 16'sı azot ve % 0-3'ü kükürtten ibarettir. Bunların yanısıra fosfor, demir, iyod, bakır, çinko ve mangan gibi bazı elementler de birtakım spesifik proteinlerde bulunur.

Bu bölümde önce proteinlerin yapı taşları olan amino asitler , bunların protein yapısını nasıl oluşturdukları, proteinlerin sınıflandırılması, çözeltilerdeki davranışları ve saflaştırılmaları anlatılacaktır. Protein yapısında olan enzimler ise, farklı özelliklerinden dolayı bir sonraki bölümde incelenecektir.

4.1. AMİNO ASİTLER

Basit proteinler asit, baz veya enzimler tarafından hidroliz edildikleri zaman, yapı taşları olan α-amino asitlere parçalanırlar. α-Amino asitler, α-karbonu adı verilen karbon atomuna bir amino grubu ($-NH_2$), bir karboksil grubu (-COOH), bir hidrojen atomu (-H) ve bir yan grubun (-R) bağlanmasıyla ortaya çıkan bileşiklerdir. α-Amino asitler, birbirlerinden farklı R grubu ihtiva ederler. Buradaki R, organik kimyadaki alkil grubu manasında değildir. İyonlaşmamış halde genel formüllerini

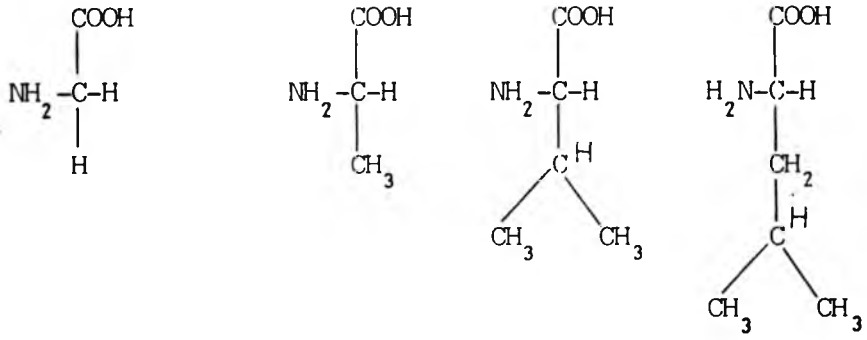


şeklinde yazabiliriz. α-Karbon atomu asimetrik olduğundan amino asitler optikçe aktiftirler. Bunların iki ayna görüntüsüne D- ve L- izomerleri denilir. Yalnız L- amino asitler proteinlerin yapısında yer alır.

Proteinler şekil, büyüklük, yük, hidrojen bağı yapma kapasitesi ve kimyasal aktivite yönünden birbirlerinden farklı yirmi çeşit amino asidi ihtiva ederler. Gerçekten bakteriden insana kadar bütün türlerin, bütün proteinleri aynı 20 amino asitten yapılmış olup, bu protein alfabesi yeryüzünde hayatın başlangıcından beri geçerliliğini sürdürmektedir. Proteinlerin birbirinden son derece farklı fonksiyonları sözü geçen amino asitlerin değişik dizilişleri ile ortaya çıkmaktadır. Aynen ciltler dolusu kitabın 29 harften yazılması gibi. İleride bu amino asit alfabesinin, proteinlerin oldukça karmaşık

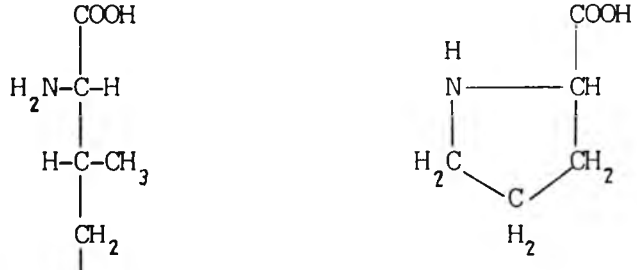
üç boyutlu yapısının ve biyolojik fonksiyonlarının ortaya çıkışına nasıl sebep olduğunu inceleyeceğiz.

Şimdi bu amino asitleri ele alalım. Bunların en basiti glisindir ve R grubu yerinde hidrojen atomu yer alır. Bu yüzden α-karbonu asimetrik değildir. Alanin ise, yan grup olarak metil ihtiva eder.



Glisin Alanin Valin Lösin

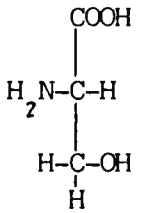
Hidrokarbon yapısında yan gruplara sahip diğer amino asitler ise, valin, lösin, izolösin ve prolindir.



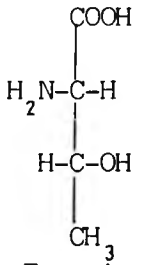
İzolösin Prolin

Bununla beraber prolin, diğer amino asitlerdeki primer amino grubu rine sekonder amino grubu taşıdığından aslında bir imıno asittir. Prolindeki R grubu, hem α-karbonuna hem de amino grubuna bağlanarak siklik bir yapı oluşturur.

Serin ve treonin amino asitleri, alifatik hidroksil grupları ihtiva ederler. Protein yapısında sözü geçen hidroksil gruplarının biyolojik fonksiyonları noktasından çok büyük önemi vardır.

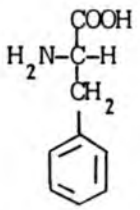


Serin

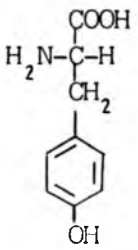


Treonin

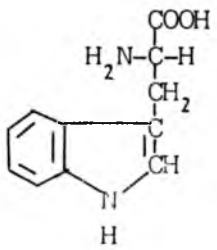
Aromatik yan gruba sahip olan amino asitler üç tanedir: fenilalanin, tirozin ve triptofan.



Fenilalanin



Tirozin

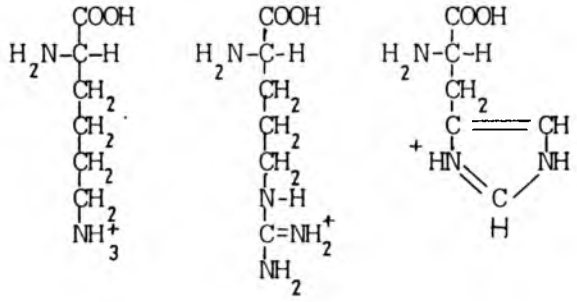


Triptofan

Buraya kadar sıraladığımız amino asitlerin yan zincirleri fizyolojik pH'de yüksüzdür. Bunlardan yalnız tirozin ve triptofanın R grupları fizyolojik pH dışında iyonlaşabilir. Yine yukarıda incelenen serin, treonin, tirozin ve triptofan haricindekiler apolar, yani hidrofobik gruplara sahiptirler. Bu amino asitlerin R grupları proteinlerin sulu çözeltilerinde molekülün iç tarafına yöneliktir.

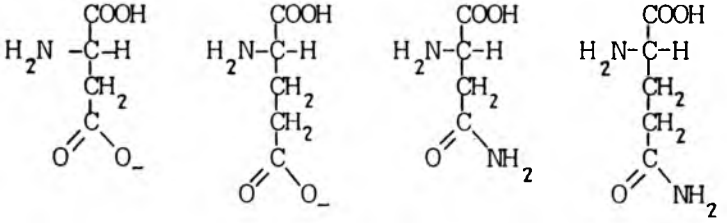
Şimdi fizyolojik pH'da pozitif yüklü yan gruplara sahip amino asitleri ele alalım. Bu amino asitler üç tanedir: lisin, arginin ve histidin. Bunlara bazik amino asitler de denilir. Bunlardan histidin yerleşim çevresine

göre bazen pozitif yüklü, bazen de yüksüzdür. R grupları



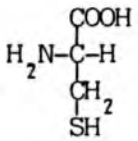
Lisin Arginin Histidin

negatif yüklü, yani asidik olan amino asitler glutamik asit ve aspartik asittir. Fizyolojik pH'da amino asitler negatif yüklü olduklarından asit isimlerinden ziyade tuz, yani anyon isimleriyle anılırlar: aspartat ve glutamat. Aspartat ve glutamatın R gruplarındaki karboksil üzerinden amid türevleri ise yüksüz olup, NH_4^+ iyonunun taşınmasında rol alırlar. Bu türev amino asitler asparagin ve glutamindir.

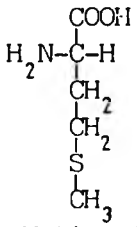


Aspartat Glutamat Asparagin Glutamin

Son olarak yan gruplarında bir kükürt atomu taşıyan iki amino asit daha vardır: sistein ve metiyonin. İleride izah edileceği gibi, sistein protein yapısında disülfid çarpraz kovalent bağlarını oluşturmasıyla özel bir öneme sahiptir. Bu amino asitler polar gruba dahildirler.



Sistein



Metiyonin

Amino asitleri kısaca üç harfli sembollerle göstermek adet olmuştur. Alfabetik sıraya göre Tablo 4.1'de bu semboller verilmiştir.

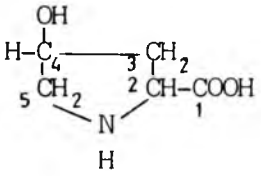
Tablo 4.1. Amino asitlerin kısaltılmış yazılışları.

Amino asit	Sembolü	Amino asit	Sembolü
Alanin	Ala	Lisin	Lys
Arginin	Arg	Lösin	Leu
Asparagin	Asn	Metiyonin	Met
Aspartik asit	Asp	Prolin	Pro
Fenilalanin	Phe	Serin	Ser
Glutamin	Gln	Sistein	Cys
Glutamik asit	Glu	Tirozin	Tyr
Glisin	Gly	Treonin	Thr
Histidin	His	Triptofan	Trp
İzolösin	Ile	Valin	Val

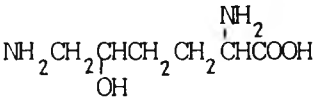
Yukarıdaki anlatılan 20 amino aside ilâveten, bazı özelleşmiş proteinlerin hidrolizlenmesiyle, bir takım değişik amino asitler de elde edilmiştir. Bunların hepsi de normal amino asitlerin türevleridir. Meselâ, 4-hidroksiprolin prolinin bir türevi olup, fibröz kollagen proteininde ve bazı bitki proteinlerinde bol miktarda bulunmaktadır. Hidroksilisin lisinin 5-hidroksi türevidir ve buna da kollagen hidrolizatlarında rastlanılmıştır. Desmozin ve izodesmozin amino asitleri de yalnız fibröz bir protein olan ve iki yönlü gerilme kabiliyetine sahip elastinde görülmüştür. Bunlar 4 lisinin bir araya gelerek oluşturduğu ve elastinin fonksiyonlarına uygun olarak dört peptid zincirinin birleşme noktası olabilecek şekle

sahip bileşiklerdir.

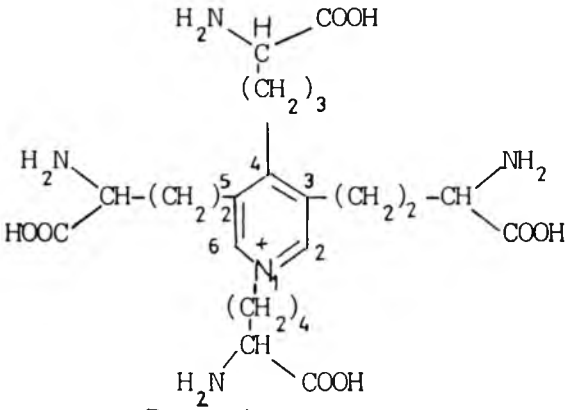
Saydığımız nadir rastlanan amino asitlere ileride daha yenileri de eklenebilir. Onların hepside normal amino asitlerin türevi olacaktır ve protein zincirleri sentezlendikten sonra gerçekleştirilen modifikasyonlar sonucu bir takım grupların ilâve veya koparılmasıyla ortaya çıkacaklardır. Çünkü protein sentezinde takip edilen genetik şifrede anormal amino asitlere tekabül eden bir şifre bulunmamaktadır.



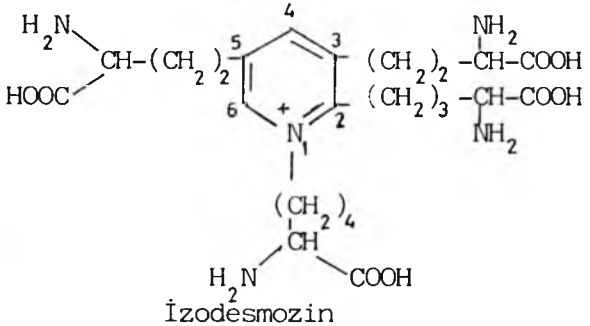
4-Hidroksiprolin



5-Hidroksilisin



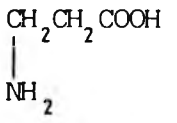
Desmozin



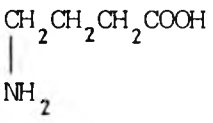
İzodesmozin

Şimdiye kadar incelediğimiz amino asitler proteinlerin yapısında bulunmaktaydılar. Bunların yanısıra bugün farklı hücre ve dokularda serbest veya birleşmiş olarak 150'den fazla çeşitte amino asitlere rastlanmıştır. Çoğu α-amino asidi olmasına rağmen β-, γ- ve δ-amino asitler de bilinmektedir. D-Glutamat gibi D-izomeri amino asitleri de bakteri hücre çeperinde bulunabilmektedir. β-Alanin bir vitamin olan pantotenik asidin başlangıç bileşiği iken sitrülin ve ornitin, hem üre devrinin ara bileşikleri hem de arginin sentezinin ön maddeleridir. Protein yapısına girmeyen bazı diğer amino asitler de, γ-aminobütirik asit gibi, sinir uyarılarının iletiminde görev yaparlar.

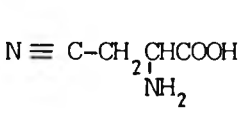
Mantarlar ve yüksek bitkiler, bugün halâ çoğunun fonksiyonları bilinmeyen olağanüstü sayıda ve bazıları acaip şekillerde amino asitler ihtiva etmektedir. Hatta bazıları bitkiler dışındaki canlılar için zehirlidir. Meselâ kanavanin, djenkolik asit ve β-siyanoalanin gibi. Son olarak adı geçen amino asitlere örnek mahiyetinde aşağıdaki bileşikleri veriyoruz.



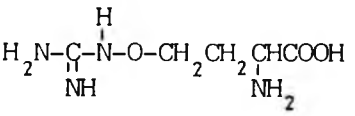
β-Alanin



γ-Aminobutirik asit



β-Siyanoalanin



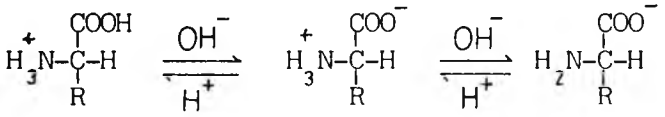
Kanavanin

4.2. AMİNO ASİTLERİN ASİT-BAZ ÖZELLİKLERİ

Amino asitlerin asit-baz özelliklerinin bilinmesi proteinlerin birçok özelliklerini anlamak ve incelemek için son derece önemlidir. Farklı amino asitleri ayıra-

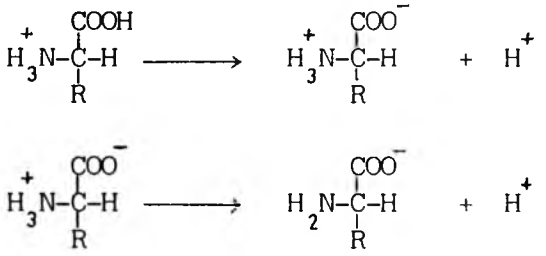
bilmek, teşhis edebilmek ve miktarını tayin edebilmek, proteinlerin amino asit bileşimlerini belirlemek için çok lüzumludur. Bu da amino asitlerin asit-baz özelliklerini iyi kavramakla mümkündür.

Kristal haldeki amino asitlerin erime noktaları 200°C ve daha yukarıdır. Sudaki çözünürlükleri, daha az polar çözücülere nisbeten daha fazladır. Bu özellikler de ancak amino asitlerin nötral sulu çözeltilerinden dipolar iyonlar halinde yani zwitter-iyon şeklinde kristallendiğini göstermektedir. Nötralliğe yakın çözeltilerde dipolar hali gözlenen amino asitlerin, düşük pH'larda katyon, yüksek pH'larda ise anyon şekli müşahede edilmektedir. Herhangi bir amino asidin, pH'nın fonksiyonu olarak iyonlaşmasını şöyle gösterebiliriz:

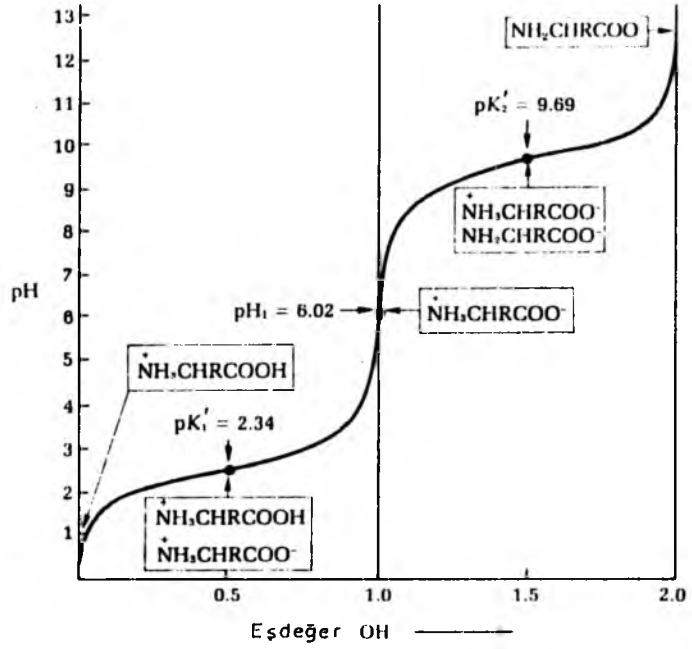


Katyon (pH=1) | Zwitter iyon (pH=7) | Anyon (pH=11)

Yukarıda görüldüğü gibi bir amino asit, R grubu üzerindeki iyonlaşabilir kısımları gözönüne alınmadan, iki proton yüklenebiliyor ve bunları, iki eşdeğer bazla titre edildiği zaman tamamen verebiliyor. Bu tip bileşiklere dibazik bileşikler adı verilr. İlâve edilen baz miktarının artışına göre bir amino asidin protonlarını verişini aşağıdaki iki reaksiyonla gösterebiliriz.



Bu reaksiyonları alaninin iki eşdeğer NaOH ile titrasyonunun eğrisi üzerinde inceleyelim. Şekil 4.1'de tamamen katyon halindeki alanin çözeltisine yarım eşdeğer OH^- ilâve edildiği andaki pH, ilk protonun ayrışma denge sabitinin eksi logaritmasını, yani pK'sını vermektedir. Çünkü bu noktada çözeltide proton veren ($NH_3^+CHRCOOH$) ve proton alan ($NH_3^+CHRCOO^-$) mol sayıları aynıdır. Aynı şekilde pH 9,69'da alanin moleküllerinin yarısında ikinci proton ayrışmış olur ve bu noktada da $NH_3^+CHRCOO^-$ ve $NH_2CHRCOO^-$ konsantrasyonları birbirine eşittir. pH 9,69 aynı zamanda pK_2'dir. Eğer pK_1' ve pK_2' değerleri biliniyorsa Henderson-Hasselbalch eşitliğini kullanarak herhangi bir pH'da çözeltideki amino asidin iyonik şekillerinin oranını bulabiliriz.



Şekil 4.1. Alaninin titrasyon eğrisi.

Alaninin titrasyonunda bir eşdeğer OH^- ilâve edildiği zaman pH 6,02'ye erişir. Bu noktada alaninin tamamı zwitter iyon halindedir ve bir molekül üzerindeki toplam

yük sıfırdır. Bu yüzden bu pH'da alanin bir elektrik alanına maruz bırakılırsa hiçbir tarafa hareket etmez. Bu noktadaki pH değerine izoelektrik pH denir ve pH_I ile gösterilir. pH_I, pK'_1 ve pK'_2 'nün aritmetik ortalamasıdır. Yani

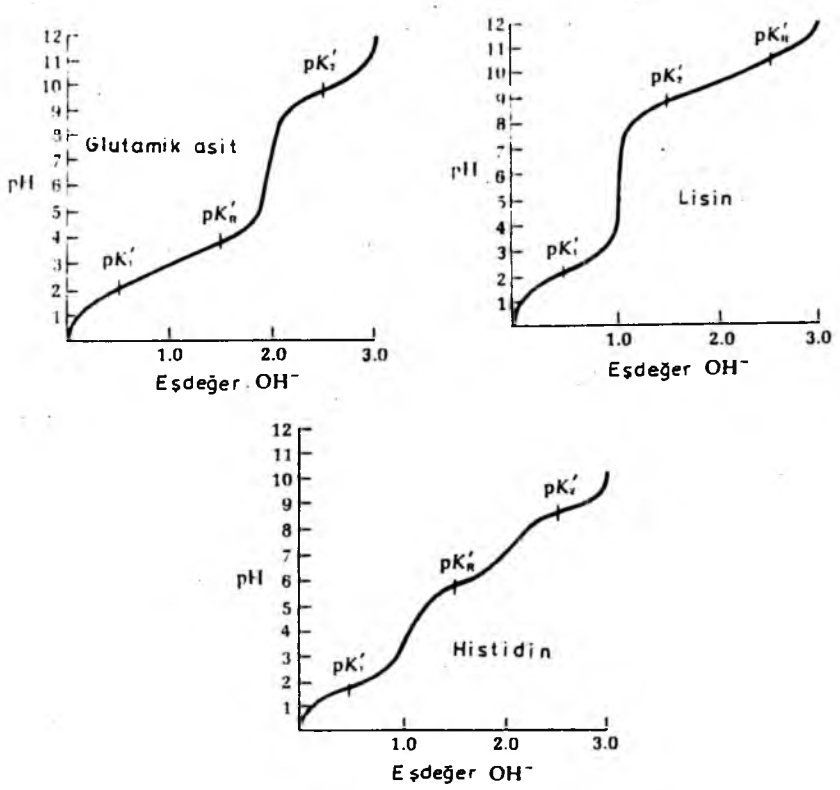
$$pH_I = \frac{pK'_1 + pK'_2}{2} \quad \text{'dir}$$

Tablo 4.2, bazı amino asitlerin iyonlaşabilir gruplarının pK' değerlerini vermektedir. Tablodan görüleceği gibi, R grubu iyonlaşmayan amino asitlerin pK' değerleri hemen hemen aynıdır. α-Karboksil grupları, asetik asit (pK=4,76) ve laktik asit (pK=3,80) gibi alifatik asitlerden daha kuvvetli asittir.

İyonlaşabilir yan grublu amino asitlerin (histidin, lisin ve glutamik asit gibi) titrasyon eğrileri çok komplekstir; çünkü eğri üzerinde α-amino ve α-karboksil grupları yanında yan grupların ayrışması da gözlenmektedir (Şekil 4.2).

Tablo 4.2. Bazı amino asitlerin iyonlaşabilir gruplarının pK' değerleri (25°C).

Amino asit	pK'_1 α-COOH	pK'_2 α-NH_3^+	pK'_R R-grubu
Glisin	2,34	9,60	
Alanin	2,34	9,69	
Lösin	2,36	9,60	
Serin	2,21	9,15	
Treonin	2,63	10,43	
Glutamin	2,17	9,13	
Aspartik asit	2,09	9,82	3,86
Glutamik asit	2,19	9,67	4,25
Histidin	1,82	9,17	6,00
Sistein	1,71	10,78	8,33
Tirozin	2,20	9,11	10,07
Lisin	2,18	8,95	10,53
Arginin	2,17	9,04	12,48



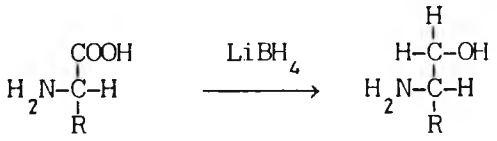
Şekil 4.2. Glutamik asit, lisin ve histidinin titrasyon eğrileri.

4.3. AMİNO ASİTLERİN IŞIK ABSORBSİYONU

Amino asitlerin hiçbirisi görünür bölgede ışığı absorblamazlar. Yalnız üç tanesi (tirozin, triptofan ve fenilalanin) önemli miktarda ultraviyole ışığı soğururlar. Protein moleküllerinin birçoğu, yaklaşık sabit oranda, tirozin ihtiva ettiğinden, 280 nm deki ışık absorbsiyonunun spektrofotometrik ölçümü sonucu çözeltideki protein miktarı kolay ve hassas olarak tayin edilebilir. Bütün amino asitler 220 nm den daha düşük dalga boylarında absorbsiyon verirler.

4.4. AMİNO ASİTLERİN KİMYASAL REAKSİYONLARI

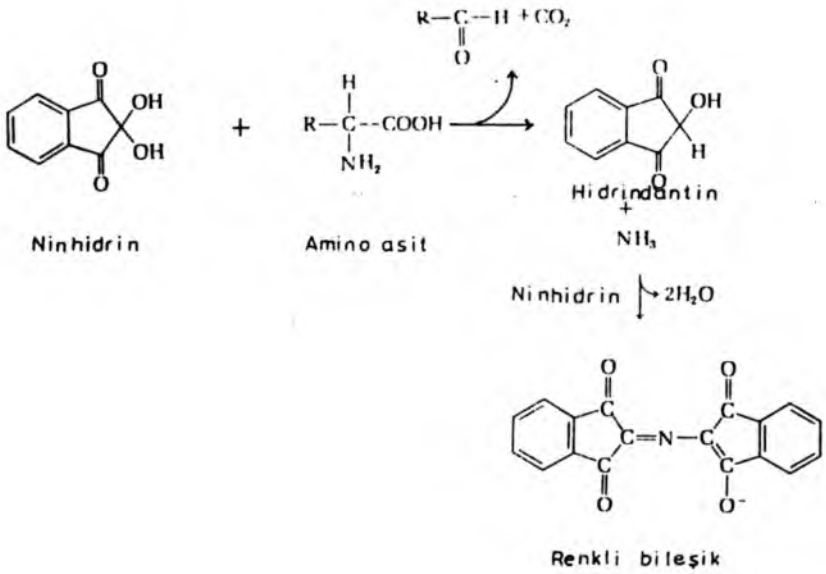
Amino asitlerin karakteristik reaksiyonları, yapılarındaki α-amino ve α-karboksil grupları tarafından verilmektedir.α-Karboksil grupları, organik kimyada görülen amidleri, esterleri ve açil halojenürleri veren reaksiyonları gerçekleştirirler. Burada yalnız amino asitlerin ve polipeptidlerin analizinde çok kullanılan karboksil grubunun indirgenmesi verilecektir.



Bu reaksiyonla α-amino asidin karboksil grubu kuvvetli bir indirgeyici olan lityum borhidrür ile α-amino alkole indirgenmektedir.

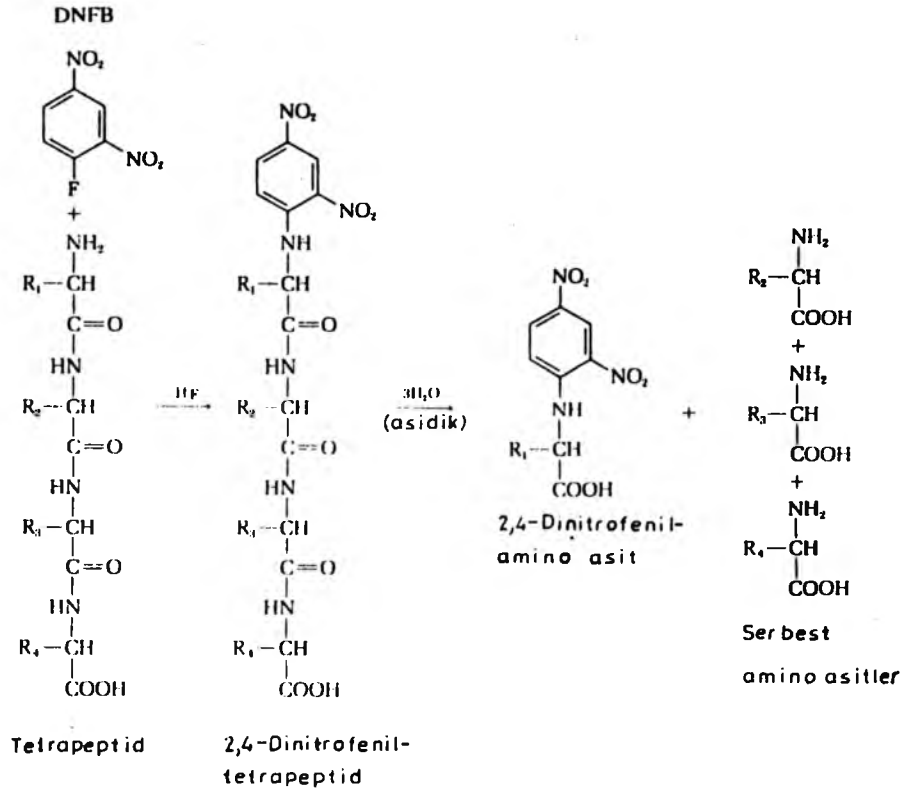
Amino asitlerin α-amino grupları da, yine organik kimyada geçen, asit halojenürleri veya anhidridleriyle açillendirilebilir. Açillendirme ılımlı şartlarda gerçekleştirilirse α-karbonunun stereokimyası muhafaza edilir, aksi takdirde, meselâ ısıtılırsa, rasemleşme gözlenir.

α-Amino grubunun en karakteristik ve çok kullanılan reaksiyonu ninhidrin ile vermiş olduğu reaksiyondur. Bu yolla çok az miktardaki amino asitlerin kantitatif tayini yapılabilir. α-Amino asitlerin iki eşdeğer ninhidrinle ısıtılması sonucu mavi renkli bir bileşik teşekkül eder ve bunun kolorimetrik ölçülmesi ile amino asitlerin miktarı belirlenir. Bu mavi renk serbest amino grubu olan bütün amino asitler ve peptidler tarafından verilir. Sekonder bir α-amino grubuna sahip olan prolin ve hidroksiprolin bu reaksiyon sonucu sarı renkte bir bileşik oluştururlar.



∝-Amino grubunun bir başka önemli reaksiyonu da 2,4-dinitroflorbenzen (DNFB) iledir. Bu reaksiyon Frederick Sanger tarafından amino asit ve peptidlerin amino gruplarını işaretlemek için geliştirilmiştir. Az alkali bir çözeltide DNFB, ∝-amino asitleri sarı renkteki 2,4-dinitrofenil türevlerine dönüştürür ve bunlara DNP-amino asitleri adı verilir. Bu metod polipeptid zincirlerinin amino ucunda yer alan amino asitlerin teşhisinde çok önemlidir. DNFB lisinin R grubundaki $-NH_2$ ile de reaksiyon verir. Fakat bu türev kromatografik yolla kolayca diğer ∝-amino türevlerinden ayırdedilir (Şekil 4.3).

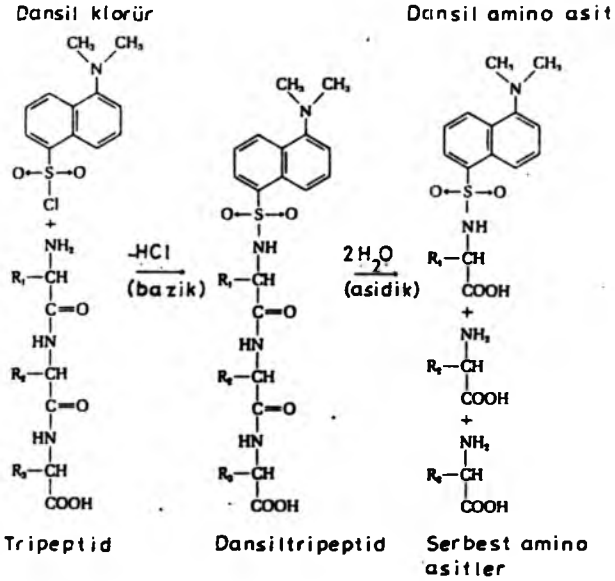
Son zamanlarda amino gruplarının yine benzer bir reaksiyonla, 1-dimetilaminonaftalin-5-sülfonil klorür (kısaca dansil klorür) bileşiği ile işaretlenmesi başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. Dansil grubu floresans bir madde olduğundan, bunun amino asit türevleri florometrik metodlarla çok düşük miktarlarda bile belirlenmektedir (Şekil 4.4).



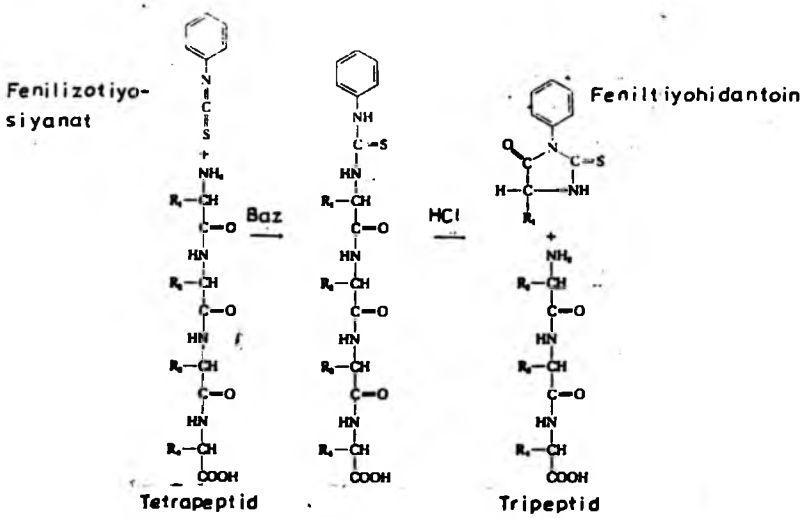
Şekil 4.3. Sanger reaksiyonuna göre bir tetrapeptidin N-terminal amino asidinin teşhisi.

Polipeptid zincirlerinin amino asit sıralanışı tayininde yararlanılan ve amino grubu üzerinde gerçekleştirilen, en önemli ve en çok kullanılan bir başka reaksiyon da Edman reaksiyonudur. Burada fenilizotiyosiyanat, bir peptidin serbest amino grubuyla feniltiyokarbamil-peptid vererek reaksiyona girer. Susuz asitle muamele sırasında N-terminal amino asit feniltiyokarbamil-amino asit olarak ayrılır, diğer zincir bozulmamış halde kalır.

Feniltiyokarbamil-amino asit daha sonra feniltiyohidantoin türevi haline dönüşür. Bu türev de gaz kromatografisiyle kolayca ayrılabilir ve teşhis edilebilir (Şekil 4.5).

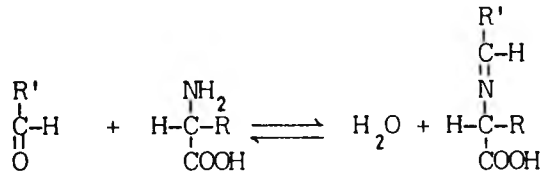


Şekil 4.4. Dansil türevi olarak bir tripeptidin N-terminal amino asidinin teşhisi.



Şekil 4.5. Edman reaksiyonu vasıtasıyla N-terminal amino asidinin teşhisi.

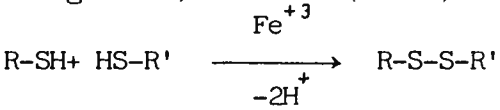
Amino asitlerin ∝-amino grupları aldehidlerle Schiff bazı adı verilen az kararlı bileşikler oluşturacak şekilde reaksiyona girerler. Schiff bazı, substratları ∝-amino asitler olan enzimlerin reaksiyon mekanizmalarında bir ara bileşik olarak görülmektedir.



Bir Schiff bazı

Amino asitler, R gruplarında ihtiva ettikleri fonksiyonel grupların üzerinden reaksiyonlar verirler. Meselâ sisteinin -SH, tirozinin -OH ve argininin guanidyum grupları üzerinden. Bu reaksiyonların bazıları kalitatif teşhis yönünden yararlı olmasına rağmen, daha hassas tayin ve teşhis için kağıt kromatgrafisi ve ileride çalışma prensiplerini inceleyeceğimiz iyon-değişim kromatografisi daha çok kullanılmaktadır.

Sisteinde bulunan -SH grubu ayrıca incelenmesi gereken değerdedir. Zayıf asit özelliğini taşıyan bu sülfhidril (veya tiyol) grubu, reaksiyona girmeğe oldukça yatkındır. Alkali çözeltilerde bir seri kompleks reaksiyonlar sonucu kükürt kaybolur. Sistein eser miktarda da olsa ağır metal iyonlarına maruz bırakıldığı zaman merkaptanlar teşekkül eder. Demir tuzlarının mevcudiyetinde iki sistein molekülü -SH grupları üzerinden oksitlenerek (yükseltgenerek) disülfid (-S-S-) bağlarını oluşturur.



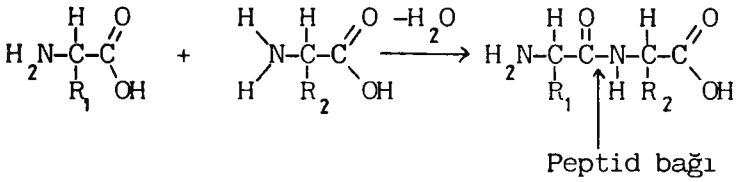
Sistein birçok enzimlerin, aktif ve katalitik bölgelerinin çok önemli bir bileşenidir. Bu tip enzimler Ag^{+} veya Hg^{+2} gibi ağır metal iyonlarıyla muamele edilirlerse -SH üzerinden merkaptanlar hasıl olur ve enzim de aktivi-

tesini kaybeder.

Sistein, protein yapısındaki çarpraz bağların teşekkülünde çok önemlidir. Protein zincirinin farklı yerlerindeki sistein birimleri, -SH grupları üzerinden yükseltgenmesiyle disülfit bağı oluşturarak, zincir içinde kovalent çarpraz bağlantıları meydana getirirler.

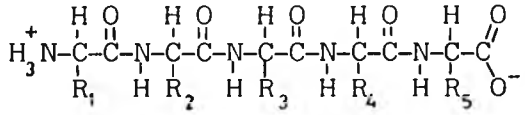
4.5. PEPTİD BAĞI VE ÖZELLİKLERİ

Proteinler, amino asitlerin birbirine bağlanması sonucu teşekkül eder. Bu ise bir amino asidin α-karboksil grubu ile bir diğer amino asidin α-amino grubu arasında bir H_2O molekülünün açığa çıkmasıyla oluşan kovalent bir bağla gerçekleşir. Bu bağa peptid bağı denir. Peptid bağı bir çeşit amid bağıdır. Yan grupları R_1 ve R_2 olan iki amino asit arasındaki peptid bağı teşekkülü reaksiyonunu şöyle gösterebiliriz:



İki amino asidin birleşmesiyle oluşan bu bileşik bir dipeptid olup, tripeptid, tetrapeptid, pentapeptid vs. isimleri de üç,dört,beş vs. amino asit ihtiva eden peptid zincirlerine verilir. Çok sayıda amino asidin meydana getirdikleri uzun peptid zincirlerine polipeptid zinciri veya protein zinciri adı verilir. Bir polipeptid zincirinin serbest halde bir amino ($-NH_2$) bir de karboksil ($-COOH$) ucu vardır. Nötral ortamda iyonlaştıklarını düşünürsek bir peptid zincirini $NH_3^+\sim\sim\sim\sim\sim COO^-$ şeklinde gösterebiliriz. Peptid zincirini oluşturan amino asitlerin herbirisine rezidü (kalıntı) adı verilir. Peptid zincirlerinin amino asit bileşenlerinin okunmasına amino ucundan başlanır ve her amino asidin sonuna "il" eki getirilir ve karboksil ucundaki aynen okunur. NH_2-

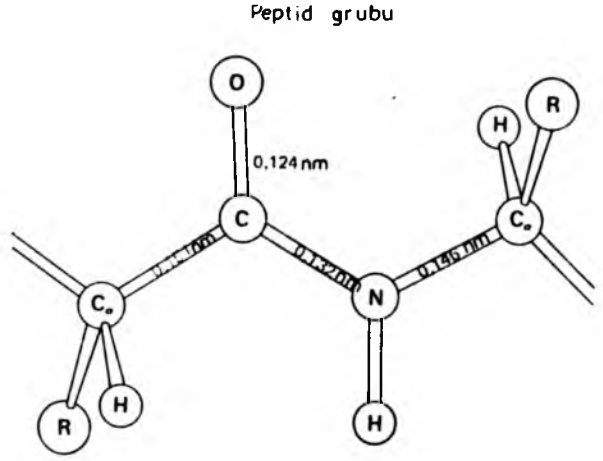
(Ala-Gly-Tyr-Leu)COOH kısa şekliyle gösterebileceğimiz bir tetrapeptidi isimlendirelim: Amino ucundan başlayarak "alanil-glisil-tirozil-lösin" şeklinde yazarız. Şimdi bir pentapeptidin açık formülünü yazalım:



Görüldüğü gibi peptid zinciri, düzenli şekilde tekrar eden atomlardan (α-C, karboksil C, amino N) oluşan bir omurgaya sahiptir ve bu omurga her uzunluktaki protein zincirinde aynıdır. Yan gruplar bu omurganın çevresinde yer alır. Bir protein zinciri üzerinde amino asitler arasında peptid ve disülfit bağlarından başka kovalent bağlanma yoktur.

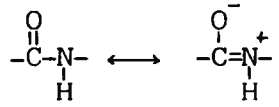
Proteinlerin en çarpıcı özelliklerinden birisi çok iyi tesbit edilmiş bir üç boyutlu yapıya sahip olmalarıdır. Gevşek veya gelişigüzel düzenlenmiş bir polipeptid zinciri için biyolojik aktiviteden bahsedilemez. Fonksiyon görebilme yeteneği proteinin konformasyonundan, yani proteini oluşturan atomların fizyolojik ortamda üç boyutlu mekânda belirli bir yapı içinde düzenlenmesinden kaynaklanmaktadır. Bir proteinin konformasyonunun belirlenmesinden birinci derece sorumlu amino asitlerin sıralanışıdır.

1930'ların sonlarında Linus Pauling ve Robert Corey amino asitler ve peptidlerin yapılarını tam olarak ortaya koyabilmek için x-ışını kristalografisi çalışmalarına başladılar. Niyetleri peptid zincirlerinde bağ uzunlukları ve bağ açıları hakkında bir takım bilgiler elde etmek ve bunları protein konformasyonu üzerindeki yorumlamada kullanmaktı. Önemli buluşlarından birisi peptid biriminin eğilmez, bükülmez (rijid), düzlemsel bir yapıya sahip olduğudur. Ayrıca azota takılı hidrojen karbonil oksijeniyle transdır (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. Bir peptid bağını oluşturan atomlar.

Peptid biriminin karbonil karbon atomuyla azot atomu arasındaki bağın dönme serbestliği yoktur, çünkü bu bağ karbonil grubundaki rezonans kararlılığından dolayı kısmi bir çift bağ özelliği taşır Bu yüzden de peptid grubu düzlemseldir. Re onans hali şöyledir:



Peptid bağının uzunluğu 1,32 A° olup, C-N tekli bağı (1,49 A°) ile C=N çift bağının (1,27 A°) arasındadır. Bunun aksine ∝-C ile karbonil C atomları arasındaki bağ tam bir tekli bağdır. Aynı şekilde ∝-C ile N atomları arasındaki bağ da tekdir. Bunlardan dolayı rijid bir yapıya sahip peptid biriminin her iki tarafındaki bağlar etrafında yüksek derecede bir dönme serbestisi vardır. Peptid bağının yukarıdaki izah edilen özelliklerinin protein yapısında nasıl etkili olduğunu az sonra inceleyeceğiz.

4.6. PROTEİNLERİN YAPISI

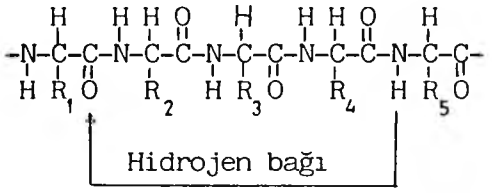
Bir protein zincirinin amino asitlerin birleşmesiyle husule geldiğini gördük. Yalnız amino asitlerin sıralanması ile ortaya çıkan bir protein molekülü her za-

man biyolojik aktivite gösteremez. Biyolojik fonksiyonunu yerine getirebilmek için bazen amino asit yapısında olmayan, metal iyonları, karbohidratlar, lipidler, koenzimler, porfirin halkaları vs. gibi kimyasal birimlerle birleşirler; bazen de birden fazla polipeptid zinciri biraraya gelerek birtek biyolojik görevi üstlenirler. Meselâ kanda O_2 taşınmasını üstlenen hemoglobin, dört polipeptid zincirinden ibarettir. Bu tip proteinlerde zincirlerin herbirisine alt birim adı verilir. Hemoglobin 4 alt birimin yanısıra hem grubu adı verilen, porfirin halkası ve demir iyonundan ibaret, amino asit yapısında olmayan bir gruptan da 4 adet ihtiva eder. Proteinlere yapışık olan bu tip yapılara prostetik grup adı verilir.

Şimdiye kadar amino asitlerin peptid bağlarıyla birleşip, bir ucunda serbest $-NH_2$ ve diğer ucunda da serbest -COOH grubu olan bir polipeptid zinciri oluşturduğunu ve bu zincir yapısı içinde disülfit çarpraz bağlanmalarının da bulunduğunu belirtmiştik. Yüzlerce amino asidin oluşturduğu bu uzun protein molekülünün sulu çözelti içinde tek bir zincir yapısını muhafaza etmesi mümkün değildir. Amino asitlerin yan grupları ve polipeptid zinciri omurgası üzerindeki polar bölgeler arasında bir takım etkileşmelerin olacağı muhakkakdır. Acaba grupların böyle karşılıklı tesirleri sonucu gelişigüzel bir katlanmamı veya düzenli ve tekrarlanan bir yapımı teşekkül ediyor? Bu soruyu cevaplandırmak üzere Pauling ve Corey birçok polipeptid konformasyonunu, moleküler modellerini yaparak değerlendirdiler. 1951'de bu çalışmalarına dayanarak iki tip periyodik polipeptid yapısı ileri sürdüler: α-sarmalı ve β-kırmalı tabaka.

α-Sarmalı, çubuğumsu bir yapıdır. Sıkıca sarılmış polipeptid omurgası çubuğun iç kısmını teşkil ederken, R grupları da bir sarmal düzeninde dışarıya doğru uzanırlar. α-Sarmalı, zincir omurgası üzerindeki NH ve CO grupları arasında oluşan hidrojen bağlarıyla stabilize edilirler. Her bir amino asidin -CO grubu, lineer sıralanışta kendisinden 4 rezidü sonra gelen amino asidin NH

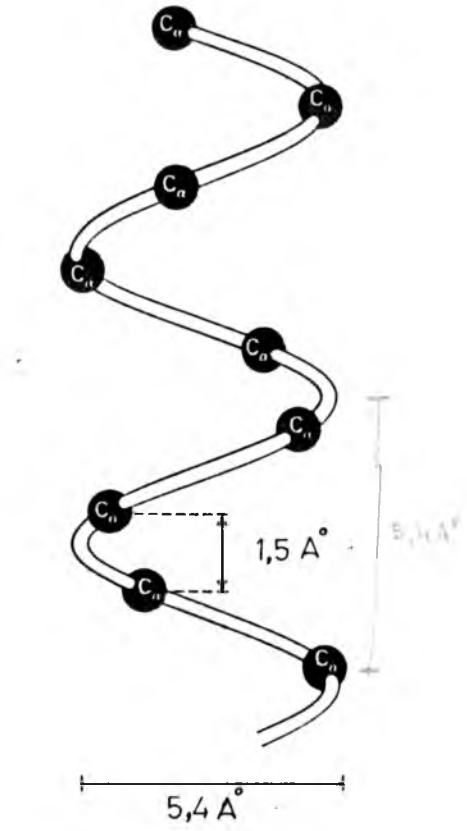
grubuna hidrojen bağıyla bağlanır.



Böylece protein omurgası üzerinde bulunan bütün CO ve NH grupları hidrojen bağları teşkil ederler. Eğer sarılmayı yukarıya doğru düşünürsek, birbirini takip eden amino asitler arasında 1,5 A°'luk bir mesafe, 100°'lik bir dönüş gözlenir. Sarmalın bir dönüşü 3,6 adet amino aside tekabül ettiğine göre (360/100=3,6), aynı zamanda bir dönüşün yüksekliği 5,4 A° (1,5x3,6) olarak bulunur. Sarmal sağ el veya sol el yönünde teşekkül edebilirse de bütün bilinen proteinlerde α-sarmal sağ el yönündedir (Şekil 4.7).

Üç boyutlu yapısı bilinen proteinlerde α-sarmal muhtevası birbirinden oldukça farklıdır. Miyoglobin ve hemoglobin gibi bazılarında α-sarmalı proteine hâkim motiftir. Bir sindirim enzimi olan kimotripsin gibi bazılarında ise α-sarmalı yok denebilecek kadar kısadır. Bunlarda α-sarmalı çubuğunun uzunluğu 40 A°'dan kısadır. α-Sarmalının hâkim olduğu yapılarda çubuk uzunluğu 1000 A° ve daha uzundur. Bazen iki veya daha fazla sayıda α-sarmalı bir kablo gibi birbiri üzerine sarabilir. Bu şekildeki proteinlere örnek olarak saç keratinini, kastaki miyozin ve tropomiyozini, derideki epidermini ve kan pıhtısındaki fibrini verebiliriz.

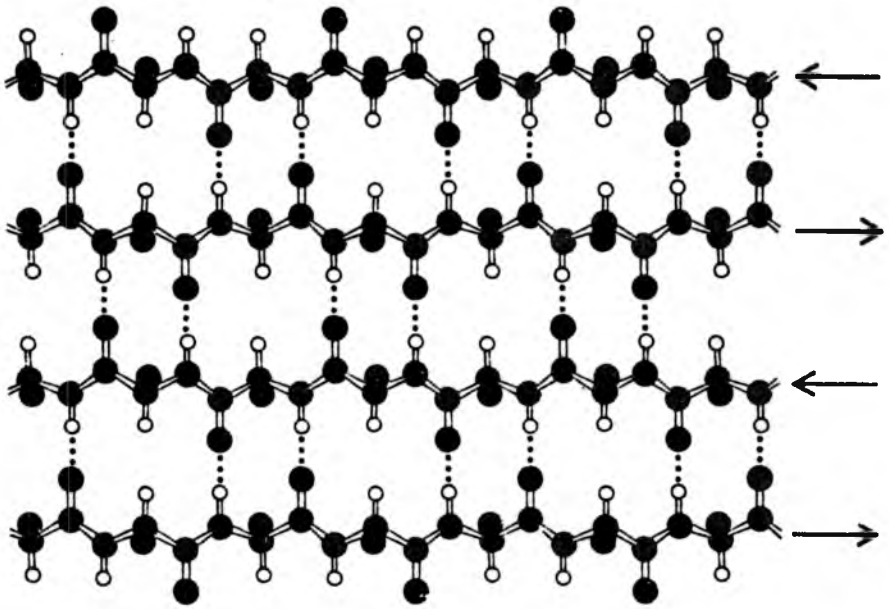
α-Sarmalın yapısı Pauling ve Corey tarafından, miyoglobinin x-ışınları yardımıyla gerçek yapısının ortaya koyulmasından altı yıl önce belirlenmiştir. Bu olay moleküler biyolojide bir kilometre taşıdır, çünkü böylece bir polipeptid zincirinin konformasyonunun, bileşenlerinin tam olarak bilinmesiyle, önceden tahmin edilebileceği gösterilmiştir.



Şekil 4.7. Sağ el yönündeki bir ∝-heliks modeli.

Aynı yılda Pauling ve Corey, proteinlerde ikinci bir yapısal periyodik motif keşfettiler ve ona da **β-kırmalı tabaka** adını verdiler (β harfi ∝-sarmaldan sonra ikinci yapı olarak bulunduğu için kullanılmıştır). β-Kırmalı tabaka, ∝-sarmalların çubuk yapısının rağmına tabaka halindedir. β-Kırmalı tabakada polipeptid zinciri ∝-sarmalde olduğu gibi sıkıca sarılmış halde değil, tamamen uzanmış yapıdadır. Birbirine komşu amino asitler arasındaki eksensel mesafe 3,5A°'dur (∝-sarmalde 1,5 A° idi). Bir diğer farkta β-kırmalı tabaka farklı polipeptid zincirlerindeki NH ve CO grupları arasındaki hidrojen

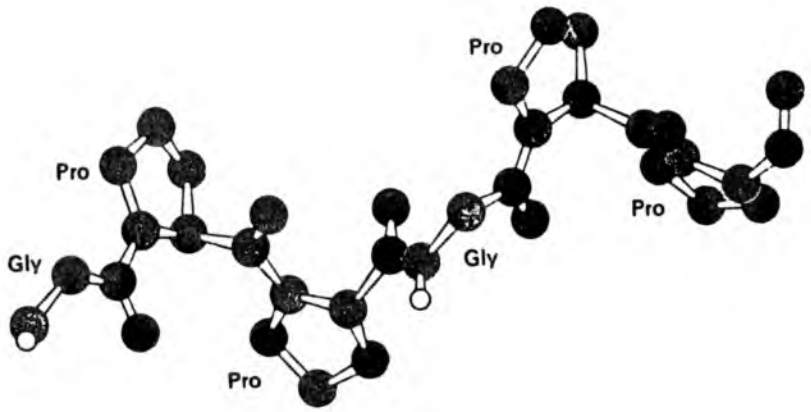
bağlarıyla stabilize edilmektedir. ∝-Sarmalde ise H-bağları aynı zincir üzerindeki gruplar arasında teşekkül etmektedir. Bir β-kırmalı tabakada bitişik zincirler aynı yöndedir (paralel tabakası) veya zıt yöndedir (antiparalel tabakası). Meselâ ipek fibroin proteini tamamen antiparalel β-tabakalarının yığılmasıyla oluşur. Birçok proteinlerde böyle β-tabakalı bölgeler tekrarlanan yapısal motiflerdir. Özellikle iki ile beş paralel veya antiparalel β-zincirlerini ihtiva eden yapısal birimlere proteinlerde çok rastlanır (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. Antiparalel β-kırmalı tabaka modeli.

Üçüncü tip periyodik motifte **kollagen sarmalıdır.** Bu yapı deri, kemik ve eklemlerin başlıca proteini olan kollagenin yüksek gerilme gücünü sağlayan özelliğini verir. Bütün kollagen moleküllerinde glisin sayısı bütün amino asitlerin üçte biri kadardır. Yine diğer proteinlerde görülmeyen şekilde fazla miktarda prolin ihtiva ederler. Bunların yanında 4-hidroksiprolin ve 5-hidroksilisin amino asitlerinin de bol olması kollagen proteinlerinin bir karakteristiğidir. Bu yapıda üç polipeptid

zinciri birbiri üzerine sarılmıştır. Herbir zincirin sarmal motifi α-sarmaldan tamamen farklıdır. Bu yapıyı stabilize eden hidrojen bağları, zincirlerin birisinin üzerindeki glisinin NH gruplarıyla bir diğer zincir üzerindeki amino asitlerin CO grupları arasında teşekkül eder. Bu tip yapıya sahip tropokollagende sarmalın uzunluğu 3000 A°'u, çapı da 15 A°'u bulur. Kollagen sarmalının kararlılığı prolin ve hidroksiprolin rezidülerinin kilitleme özelliğine ve yine hidroksiprolin üzerindeki hidroksi grubunun hidrojen bağı yapabilmesine de atfedilebilir (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. Kollagen üçlü heliksinin tek bir zincirinin konformasyonu.

Birçok proteinler sıkı ve globuler şekillere sahiptirler, çünkü polipeptid zincirlerinin yönleri sık sık değişmektedir. Zincirlerin çoğunun aynı tarzda dönüşler yaptığı ortaya konulmuş ve bu yapıya β-dönüşü adı verilmiştir. Saç tokası şeklindeki bu dönüşte polipeptid zincirinin n rezidüsündeki CO grubu, (n=3) rezidüsündeki NH grubuyla hidrojen bağı yapar. Böylece bir protein zin-

ciri aniden yönünü değiştirebilir.

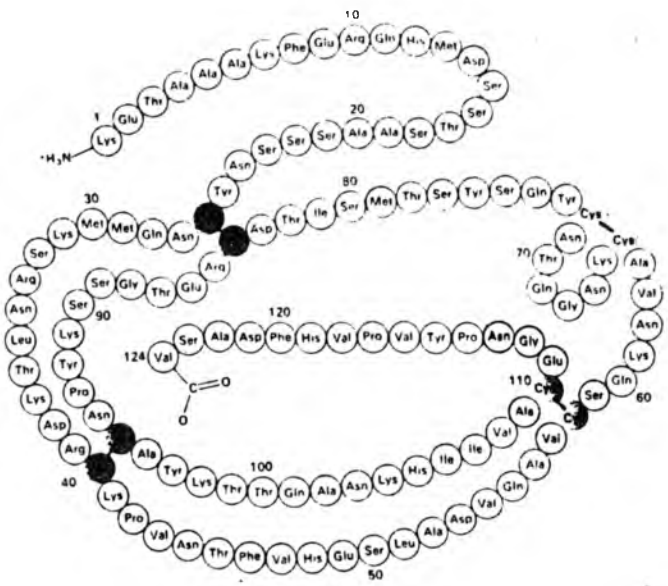
Protein yapılarıyla ilgili olarak şimdiye kadar yalnız ardarda sıralanmış amino asit rezidülerinin oluşturdukları periyodik davranışlarını gördük. Proteinler, biyolojik fonksiyonlarını yerine getirebilmeleri için gerekli olan üç boyutlu şekillerini, yukarıdaki izah ettiğimiz yapıları da kapsayan dört basamakta kazanırlar. Bu dört basamak primer, sekonder, tersiyer ve kuaterner yapılar olarak isimlendirilir.

Primer yapıyı basitçe, amino asitlerin sıralanışı ve varsa çarpraz disülfid bağları meydana getirir. Yani bu yapı protein zincirinde amino asitler arasındaki bütün kovalent bağlanmaları kapsar.

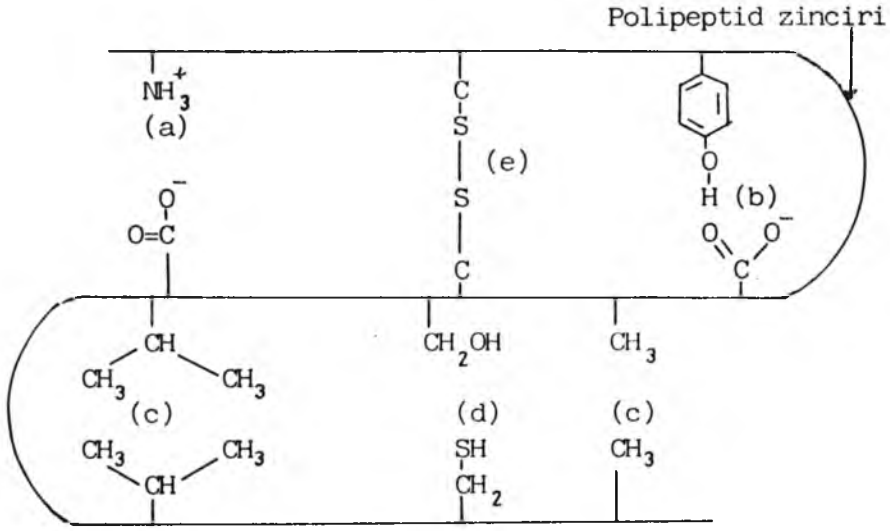
Sekonder yapı da lineer dizilişte birbirine yakın amino asit rezidüleri arasındaki sterik etkileşmeler sonucu meydana gelir. Bu etkileşmelerin bazıları periyodik ve düzenli bir özelliktedir. Meselâ α-sarmal, β-kırmalı tabaka ve kollagen sarmalı bu yapıya dahildir. Sterik etkileşmelerin çoğunluğunu H-bağları oluşturur.

Tersiyer yapı ise, lineer dizilişte birbirinden uzak noktalardaki amino asitler arasında vuku bulan sterik etkileşmelerle ortaya çıkar. Bir protein zinciri içindeki stabil katlanmalar sonucu, lineer dizilişte birbirlerinden uzakta olan amino asit rezidüleri bir araya gelirler ve hatta proteinin aktif bölgesini oluştururlar. Tersiyer yapıda belli bir düzenlilik ve periyodik şekil göze çarpmaz (Şekil 4.10).

Kuaterner yapıya ise, birden fazla polipeptid zincirine sahip proteinlerde rastlanır. Polipeptid alt birimleri, sekonder ve tersiyer yapıları meydana getiren sterik etkileşmelerle oluşan bağlar vasıtasıyla bir arada tutulur. Bir protein molekülünün yapısında etkili olan bağlar, peptid bağı hariç, Şekil 4.11'de gösterilmiştir.



Şekil 4.10. Sığırdan elde edilen ribonükleaz enziminin amino asit dizilişi.



Şekil 4.11. Proteinlerdeki bağlar: **a)** İyonik bağ, **b)** Hidrojen bağı (OH ile COOH arasında), **c)** Non-polar hidrofobik bağ ve Van der Waals etkileşmeleri, **d)** Dipol-dipol ilişkisi, **e)** Disülfit bağı.

4.7. PROTEİNLERİN SINIFLANDIRILMALARI

Proteinler, konformasyon ve bileşimlerine göre iki türlü sınıflandırılır:

4.7.a Konformasyonlarına Göre Proteinler

Fibröz ve globuler proteinler olmak üzere ikiye ayrılırlar:

Fibröz proteinler suda ve seyreltik tuz çözeltilerinde çözünmeyen sert yapıda moleküllerdir. Yapılarındaki polipeptid zincirleri tek bir eksen boyu paralel düzenlenmiş ve uzun lifler veya tabakalar oluşturmuşlardır. Daha çok sert yapıyı gerektiren veya koruyuculuk görevi yapan yerlerde bulunurlar. Meselâ deri ve kemik kollageni, tüy, tırnak, boynuz ve saç α-keratini ve bağ dokusu elastini bu proteinlerdendir.

Globuler proteinler ise, polipeptid zincirinin birbiri üzerinde katlanıp sıkı bir yumak halini almasıyla ortaya çıkar. Bu tip proteinlerin çoğu sulu çözeltilerde çözünür ve kolayca difüze olurlar. Globuler proteinlerin hücre içerisinde dinamik bir fonksiyonu vardır. Bugün bilinen binden fazla enzimin çoğu, antikorlar, bazı hormonlar, serum albümin ve hemoglobin gibi transport görevi yapan proteinler hep globuler yapıdadır.

Bazı proteinler ise, hem fibröz hem de globuler özelliklere sahiptir. Bu tip proteinler fibröz yapılarda olduğu gibi uzun çubuğumsu şekillere sahip iken, aynı globuler proteinler gibi tuzlu çözeltilerde çözünürler. Keza önemli bir yapı elemanı olan miyozin ve kan pıhtılaşmasında fibrinin ön maddesi olan fibrinojen, bu çeşit proteinlerdendir.

4.7.b.Bileşimlerine Göre Proteinler

Basit ve bileşik proteinler olarak ikiye ayrılır:

1.Basit proteinler: Tabiatta mevcut olup, yapılarında yalnız α-amino asitleri bulunduran proteinlerdir ve aşağıdaki gruplara ayrılırlar:

Albüminler: Suda çözünür, ısıtıldığında pıhtılaşır, doygun tuz çözeltileriyle çöktürülür. Örnek: serum albümin, laktalbümin.

Globulinler: Seyreltik nötral tuz çözeltilerinde çözünmez. Isıtılınca pıhtılaşır. Örnek: serum globulin, ovoglobulin.

Glutelinler: Seyreltik asit ve baz çözeltilerinde çözünür. Nötral çözücülerde çözünmez. Isı ile pıhtılaşır. Örnek: buğday gluteni.

Prolaminler: % 70-80 alkolde çözünür; mutlak alkolde, suda ve nötral çözücülerde çözünmez.

Skleroproteinler: Bütün nötral çözücüler ve seyreltik asit, baz çözeltilerinde çözünmez. Destek dokusu proteinleridir. Örnek: keratin, kollagen, elastin.

Histonlar: Suda ve seyreltik asit çözeltilerinde çözünür. Isı ile pıhtılaşmaz. Arginin ve lisin gibi bazik amino asitler çoğunluktadır. Örnek: Nükleustaki nükleohistonlar.

Protaminler: NH_4OH ve suda çözünen bazik polipeptidlerdir. Isı ile pıhtılaşmaz. Bazik amino asitler oldukça çoğunlukta olup, diğer proteinleri çöktürürler.

2.Bileşik proteinler: Protein yapısında olmayan bileşiklerin bağlı oldukları proteinlerdir ve şu gruplara ayrılırlar:

Nükleoproteinler: Bir veya daha fazla protein molekülünün nükleik asitlerle yapmış olduğu komplekslerdir. Örnek: nükleohistonlar, virüsler.

Glikoproteinler: Prostetik grup olarak karbohidratları ihtiva eden proteinlerdir. Örnek: serum elektroforezde α_1- ve α_2- fraksiyonları.

Fosfoproteinler: Fosfat bağlı proteinlerdir (nükleik asit veya fosfolipidler vasıtasıyla değil). Çok defa serin rezidüsü üzerinden. Örnek: glikojen sentetaz, kazein.

Kromoproteinler: Prostetik grup olarak renkli bir kısım ihtiva eden proteinler. Örnek: hemoglobin, flavoproteinler, sitokromlar.

Lipoproteinler: Proteinlerin nötral yağlar, fosfolipidler ve kolesterolle yapmış oldukları komplekslerdir.

Metaloproteinler: Metal iyonlarına koordinasyon bağlarıyla bağlı proteinler. Örnek: Zn^{+2} -karbonik anhidraz, Cu^{+2} -seruloplazmin, Fe^{+2}, Fe^{+3} -ferrodoksin.

4.8. PROTEİNLERİN DENATÜRASYONU

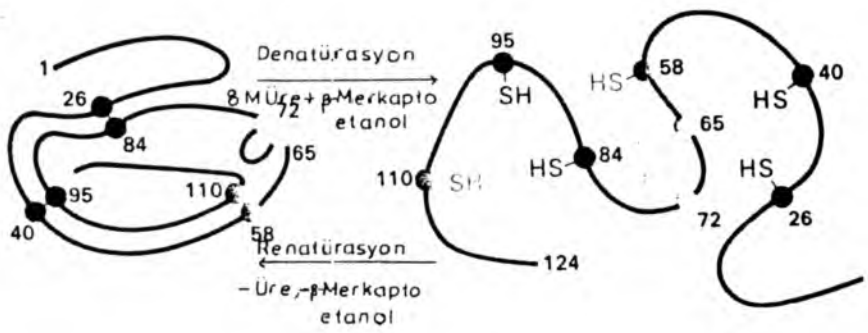
Birçok protein molekülleri biyolojik aktivitelerini ve iş görebilme kapasitelerini belirli kimyasal ortamda, sınırlı pH ve sıcaklıkta sürdürebilirler. Çok asidik ve bazik ortamlarda, yüksek sıcaklıkta ve bazı kimyasal maddeler karşısında üç boyutlu yapılarında, yani fonksiyon gören tabiatlarında bir değişme vuku bulur. Bu olaya denatürasyon denilir. Eğer denatüre olan globuler bir protein ise, çözünürlüğünde aşikâr bir azalma ve hatta çökelme olur. Birçok proteinler 50-60°C yukarısında, bazıları 10-15°C altında denatürasyona uğrarlar. Meselâ yumurta beyazının ısıtmakla beyaz renkli bir pıhtı teşekkülü **dönüşümsüz** bir denatürasyondur. Bu olay esnasında protein yapısındaki kovalent bağlar etkilenmezler, değişme yalnız bir yere kadar sekonder yapıda, büyük ölçüde de tersiyer ve varsa kuaterner yapıdadır.

Bazı proteinler denatürasyondan sonra, bu olayı

meydana getiren şartların ortadan kaldırılmasıyla, tekrar eski tabii hallerine kavuşabilmektedir. Yani biyolojik aktivitelerini yeniden kazanmaktadırlar. Bu tip denatürasyonlar **dönüşümlü** değişmelerdendir.

Denatürasyona sebep olan faktörlere yukarıda belirttiğimiz ısıtma, asit ve baz ilâvesi dışında röntgen, ultraviyole ve infrared ışınları, kuvvetli çalkalama, derişik üre, β-merkaptoetanol, guanidin klorür, sodyumdodesil sülfat çözeltileri, aseton, alkol gibi solventleri dahil edebiliriz.

Proteinlerin dönüşümlü denatürasyonu üzerinde yapılan denemeler, bu moleküllerin üç boyutlu yapıları, yani konformasyonlarıyla amino asit dizilişleri arasındaki ilgiyi ortaya çıkarmıştır. Bu ilgi üzerinde Christian Anfinsen 1964 yılında gayet enteresan deneyler yapmıştır. Anfinsen, primer yapısında 124 amino asit ve dört disülfit bağına sahip olan ribonükleaz enzimini (RNA'yı hidrolizleyen enzim) 8M üre ve β-merkaptoetanol ihtiva eden bir çözelti içinde denatüre etmiştir. Burada üre katlanmış proteini açmış ve β-merkapto etanol de disülfit bağlarını indirgeyerek sistein rezidülerinin ilk haline dönmesini sağlamıştır. Daha sonra diyaliz ile üre ve β-merkapto etanolü uzaklaştırıp hava ile oksitlenmesini temin ederek, ribonükleazın yeniden katlanıp katalitik aktivitesini tekrar kazandığını müşahede etmiştir. Yaptığı deneyleri şöyle şema ile özetlersek:



dönüşümlü bir denatürasyon olayının vuku bulduğunu görürüz. Anfinsen tekrar katlanan enzimin bütün fiziksel ve kimyasal özelliklerinin ilk haliyle aynı olduğunu bulmuştur. Christian Anfinsen'in bu deneyleri; ribonükleazın karmaşık üç boyutlu yapısıyla ilgili bilgilerin amino asit dizilişi tarafından taşındığını ve kendiliğinden aktif bir hale tekrar katlanışı da, bu halin termodinamik olarak en düşük enerjili ve en kararlı bir yapı olduğunu göstermektedir.

Şimdi şöyle bir soru akla gelmektedir: Amino asitlerin tesbih tanesi gibi yan yana dizilmesiyle husule gelen polipeptid zinciri fonksiyon görebilecek bir yapıya nasıl katlanmaktadır? Çünkü proteinler sentezlendiği zaman yalnız, disülfit bağlanmalarının da olmadığı, primer yapıya sahiptir. Muhtemelen bütün konformasyonlar denenmekte ve enerji yönünden en düşük olanda karar kılınmaktadır. Böyle bir deneme ve arayış acaba ne kadar zaman alacaktır?

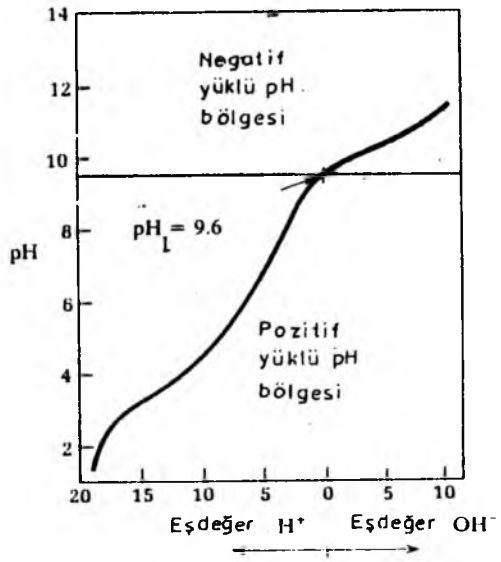
Şimdi 100 rezidü ihtiva eden küçük bir protein ele alalım. Herbir amino asidin 3 farklı konformasyonu olacağını farzedersek proteinin toplam yapı sayısı 3^{100}, yani $5x10^{47}$ olacaktır. Her bir yapıdan diğerine geçiş 10^{-13} saniye farzedilirse, toplam arayış zamanı $5x10^{34}$ saniye yani $1,6x10^{27}$ yıl sürecektir. Burada bir amino asidin konformasyon sayısı üçten fazla ve protein yapısının bir şekilden diğerine geçişi 10^{-13} saniyeden daha uzun süreceği gözönüne alınırsa bu rakamın çok düşük olduğu ortaya çıkacaktır. Gerçekten çok küçük bir proteinin bile enerjice en düşük hali bulmak üzere rasgele bütün halleri araması oldukça uzun sürecektir. Peki proteinler nasıl oluyorda bir kaç saniye veya dakikada katlanıp aktif hallere kavuşuyorlar? Bunun cevabı henüz bilinmemektedir. Bu konuda en geçerli hipotez şöyledir: Önce α-sarmalları ve β-tabakaları oluşur ve bunlar difüzyonla birbirlerini bularak $\alpha\alpha'$, $\beta\beta'$ veya $\alpha\beta$ kompleksleri meydana gelir. Bunlar da müteakip katlanmalar için çekirdek vazifesi görmektedir. Bu hipotez bir takım deneylerle de destek-

lenmekle beraber henüz daha katlanmalardaki bu ara haller tesbit edilememiştir.

4.9. PROTEİNLERİN ASİT-BAZ ÖZELLİKLERİ

Bir proteinin asit-baz özellikleri büyük ölçüde amino asitlerin iyonlaşabilir R grupları tarafından tayin edilir. Polipeptid zincirinin uçlarındaki α-amino ve α-karboksil grupların buna katkısı çok azdır. Proteinin konformasyonu içinde, iyonlaşabilir R grupları çevrelerindeki diğer R gruplarından çok etkilenirler. Bununla beraber amino asit sıra ve muhtevası bilinen globuler proteinlerin titrasyon eğrilerinden bazı önemli sonuçlar çıkarılmıştır.

Meselâ Şekil 4.5 ribonükleazın titrasyon eğrisini göstermektedir.



Şekil 4.12. Ribonükleazın titrasyon eğrisi.

Bu enzim, sırası bilinen 124 amino asit ihtiva eden ve sıkıca katlanmış bir proteindir. $-NH_2$ ve -COOH uçlarından başka 34 iyonlaşabilir R grubuna sahiptir. Ribo-

nükleazın titrasyon eğrisi birçok grubun iyonlaşmalarını aksettirmektedir. Titrasyon işleminde harcanan eşdeğer OH^- lar verilen pH aralığında iyonlaşabilen grupların sayısına tekabül etmektedir. Yumurta albümini olan β-laktalbümin üzerindede yapılan aynı deneyler, amino asit bileşimleriyle ortaya çıkan iyonlaşabilir grupların hemen hemen tamamının titre edilebildiğini ortaya çıkarmıştır. Bu da, daha sonraları x-ışınları denemeleriyle doğrulandığı gibi, globuler proteinlerde iyonlaşabilir R gruplarının tamamına yakınının dış yüzeye, hidrofobik veya apolar grupların çoğunun da içeriye yönelik olduğunu göstermektedir. Bazı globuler proteinler ise doğrudan titre edilemeyen iyonlaşabilir gruplara da sahiptirler ve bunlar tersiyer yapıda saklanmış veya hidrojen bağı yapmış olabilirler. Meselâ miyoglobindeki 11 histidinden 5'i ancak denatürasyon sonucu titre edilebilmektedir.

Birçok proteinlerle yapılan benzer titrasyon çalışmaları, proteinlerin toplam tamponlama kapasitelerinin çok azını fizyolojik pH'da (pH=6-7) gösterdiklerini ortaya çıkarmıştır. Bu aralıkta en yakın pK' histidinde vardır ve birçok protein bu amino asitten az miktarda ihtiva ederler. Hemoglobin ise, yapısında istisna olarak yüzde 8 civarında histidin bulundurduğundan eritrositlerde önemli bir intraselüler tampon vazifesini görür.

Proteinler de aynen amino asitler gibi izoelektrik pH'ya sahiptirler. Bu pH'da üzerlerindeki toplam yük sıfır olduğundan, elektriki bir alanda hiçbir yöne hareket etmezler. Proteinler nisbeten yüksek oranda bazik amino asitler ihtiva ediyorlarsa (lisin, arginin) pH_I'ları 7'den yüksek, asidik amino asitler (aspartik asit, glutamik asit) ihtiva ediyorlarsa pH_I 'ları 7'den düşüktür. Globuler proteinlerin birçoğu pH 4,5 ile 6,5 arasında pH_I'lara sahiptir. Tablo 4.3'de proteinlerin izoelektrik pH'ları verilmektedir.

İzoelektrik pH'nın üzerinde protein negatif olup elektrik alanında anoda doğru hareket ederken, pH_I nın

altında pozitif yüklü olarak katoda doğru yol alırlar.

Proteinlerin titrasyon eğrileri ve izoelektrik pH'-ları nötral tuzların mevcudiyetinde önemli miktarda değişirler. Çünkü bu şartlarda R gruplarının iyonlaşmaları etkilenir. Proteinler aynı zamanda Ca^{+2} , Mg^{+2} gibi katyonları ve Cl^{-} , PO_4^{-3} gibi anyonları da bağlayabilirler. Bundan dolayı proteinlerin gözlenen izoelektrik pH'ları çözündükleri ortamın tabiatına yakından bağlıdır.

Tablo 4.3. Bazı proteinlerin izoelektirik pH'ları.

Protein	pH
Pepsin	~1,0
Yumurta albümini	4,6
Serum albümin	4,9
Üreaz	5,0
β-Laktoglobulin	5,2
γ_1-Globulin	6,6
Hemoglobin	6,8
Miyoglobin	7,0
Kimotripsinojen	9,5
Sitokrom c	10,6
Lizozim	11,0

4.10. PROTEİNLERİN SAFLAŞTIRILMASI

Her tür organizma kendisine has proteinlere sahip olduğu gibi, her hücre tipi de binlerce değişik protein ihtiva etmektedir. Bunun yanında proteinler, biyolojik aktivitelerini ancak belirli pH ve sıcaklık sınırlarında gösterebilirler. Bu sebeplerden dolayı bir proteinin saf şekilde bir hücre veya bir dokudan izolasyonu, güç bir iş olarak düşünülebilir. Bu güçlüklere rağmen birçok protein saf olarak elde edilmiştir. Binin üzerinde enzim en az kısmen saflaştırılmış ve iki yüzden fazlası saf kristal halde elde edilmiştir. Ayrıca hiçbir enzimatik aktivite göstermeyen yüzlerce protein, yüksek bir saflık derecesinde izole edilmiştir. İzolasyon işlemleri fevkalâde bir

dikkat ve bir gayret gerektirir.

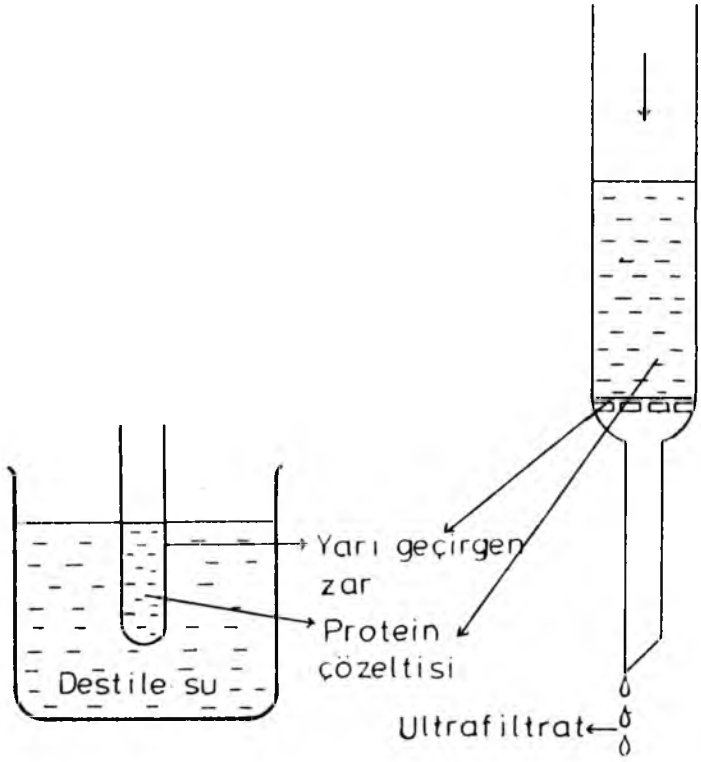
Globuler proteinlerin çözelti içindeki davranışlarından faydalanarak, onların saflaştırılması yapılmaktadır. Bu özellikler şunlardır: (a) Molekül büyüklüğü, (b) Çözünürlük, (c) Elektriksel yük, (d) Adsorbsiyon davranışlarındaki farklılıklar ve (e) Diğer moleküllere karşı biyolojik afinite.

4.10.a. Molekül Büyüklüğü Esasına Dayanarak Proteinlerin Ayrılması

Proteinlerin en göze çarpan orjinalliği onların büyüklükleridir. Bu durum, bir proteini diğer proteinlerden ve küçük moleküllerden ayırmayı mümkün kılar. Bu esasa dayalı proteinleri ayırma metodları şunlardır:

Diyaliz ve ultrafiltrasyon: Düşük molekül ağırlıklı maddeler, bir protein çözeltisinden basit diyaliz yoluyla uzaklaştırılabilirler. Bu iş için bir yarı geçirici zar kullanılır; protein molekülleri tutulur ve küçük moleküller ile su zarı geçer (Şekil 4.13). Diğer bir yol, ultrafiltrasyondur; burada basınç veya santrifügasyon kuvveti vasıtası ile sulu çözücü ve küçük çözünen moleküller, yarı geçirgen zar arasından geçerler, proteinler geri tutulurlar (Şekil 4.14). Selofan ve diğer sentetik metaryaller zar yerine kullanılabilir.

Yoğunluk gradienti santrifügasyonu: Çözünmüş haldeki proteinler, kuvvetli bir santrifügasyon alanında çökelme temayülüne sahip oldukları için protein karışımları santrifüjleme metodlarıyla ayrılabilirler. Söz konusu metot, yalnızca proteinlerin değil, aynı zamanda diğer makromoleküllerin, virüslerin ve organellerin de ayrılması için sık sık kullanılan bir yoldur. Çok kere bir santrifüj tüpü içinde, bir çeşit birleşik kap yardımıyla sakkarozdan sürekli bir yoğunluk gradienti hazırlanır. Ortamın yoğunluğu tüpün altından üstüne doğru azaltılır. Su içinde çözünmüş olan protein karışımı, tüpün üstünden

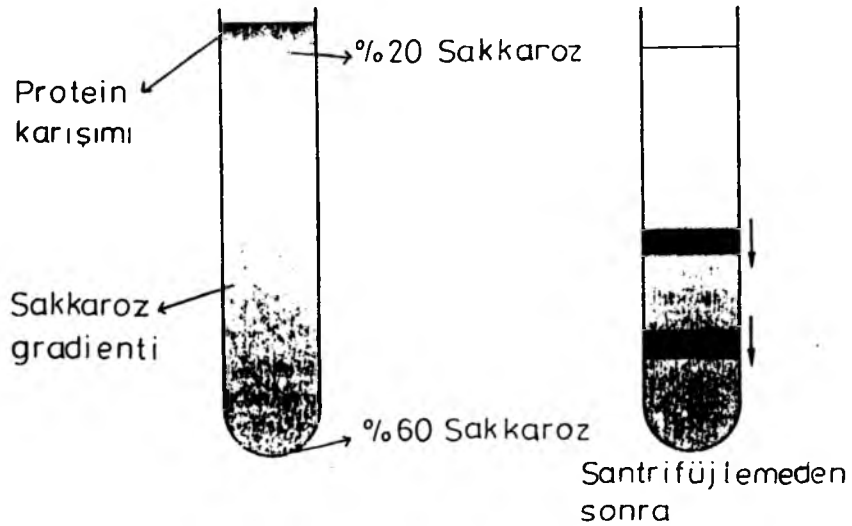


Şekil 4.13. Diyaliz. **Şekil 4.14.** Ultrafiltrasyon

tatbik edilir ve tüp santrifüj edilir. Santrifüjleme sırasında protein molekülleri büyüklüklerine, şekillerine ve konsantrasyonlarına göre ayrılırlar. Değişik bantlar meydana gelir. Bandların pozisyonu ya optik olarak değerlendirilir veya tüpün dibi delinerek muhteviyat küçük fraksiyonlara alınır ve tayin edilir. Bir başka yol olarak da tüp muhteviyatı dondurulur, ince diskler halinde kesilir ve daha sonra bu diskler analiz edilir (Şekil 4.15).

Jel filtrasyon kromatografisi: Molekül büyüklüklerine göre proteinleri ayırmada kullanılan en uygun ve en etkili metot, jel filtrasyon kromatografisidir. Bu metodda bir kolona kuvvetli hidratize olmuş polimer materyal konulur. Bu materyal Sephadex, Sepharose gibi bir poli-

sakkarit veya Biogel gibi bir poliakrilamid türevi olabilir. Jel partikülleri değişik büyüklükteki porlu şekilde hazırlanabilir.

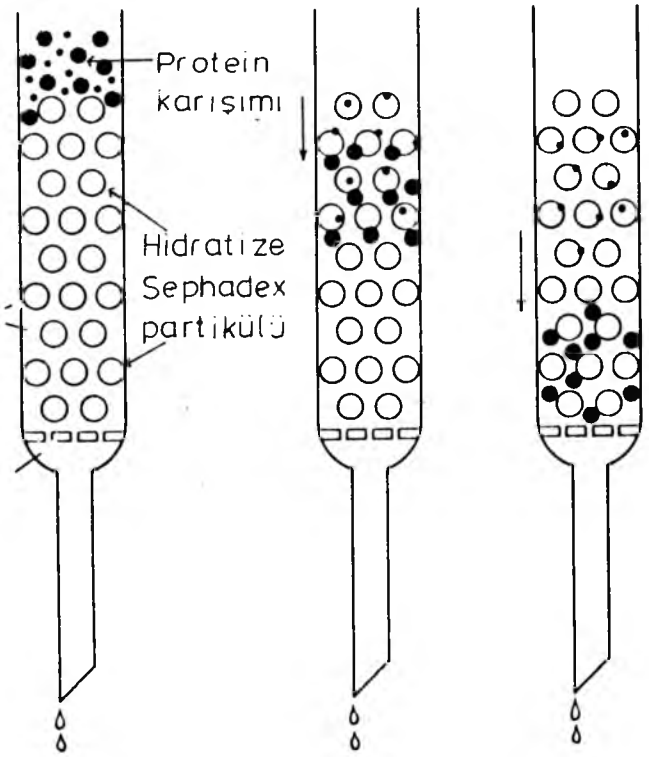


Şekil 4.15. Bir sakkaroz yoğunluk gradientinde santrifüjleme ile proteinlerin ayrılması.

Polimer materyal iyice yıkanır, tamponla dengelenir ve daha sonra aynı tampon içinde çözünmüş olan protein karışımı kolona tatbik edilir. Büyük moleküllü proteinler jel partiküllerinin porlarına giremezler ve hızlıca yürürler. Küçük moleküllü proteinler ise, porlara girerler ve akışları engellenir. Böylece eluatta önce büyük moleküllü proteinler, daha sonra da küçülen molekül büyüklüğüne göre proteinler toplanırlar. Eluatlar küçük fraksiyonlar halinde toplanarak, gerekli analizler yapılır (Şekil 4.16).

Jel filtrasyon kromatografisi, diğer makromoleküller, virüsler, ribozomlar, hücre çekirdekleri ve hatta bakteriler gibi çok daha büyük yapıların karışımlarının ayrılmasında da kullanılabilir. Bu durumlarda sadece uygun porlu jel partikülleri seçilmelidir. Bu metodda a-

yırma gücü o kadar büyüktür ki, bu basit metot proteinlerin molekül ağırlığının tayininde de kullanılabilir.

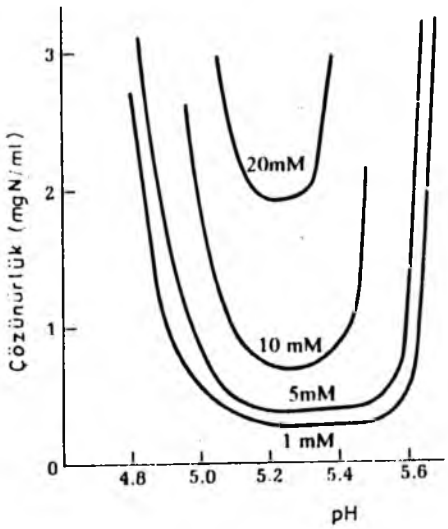


Şekil 4.16. Bir Sephadex kolonunda farklı büyüklükteki iki proteinin ayrılması; **(1)**'de protein karışımı tatbik ediliyor, **(2)**'de küçük moleküller porlara giriyor, büyük moleküller yürüyorlar, **(3)**'de iki protein birbirinden ayrılıyor.

4.10.b. Çözünürlüklerindeki Farklılıkları Esasına Dayanarak Proteinlerin Ayrılması

Proteinlerin çözünürlüğü başlıca pH, iyonik şiddet, çözücünün dielektrik özelliği ve sıcaklığa bağlıdır. Bu özelliklerden proteinleri ayırma işlemlerinde yararlanılır. Bu esaslara dayalı proteinleri ayırma metodları şunlardır:

İzoelektrik çökelme: Çoğu globuler proteinlerin çözünürlüğü, sistemin pH değeri tarafından etkilenir. Şekil 4.17, bir süt proteini olan β-laktoglobulinin çözünürlüğünün NaCl konsantrasyonuna bağlı olmaksızın, pH 5,2-5,3 arasında minimum bir değere sahip olduğunu göstermektedir. Bu kritik pH değerinin her iki yanında çözünürlük büyük ölçüde artar. Bu kritik pH, β-laktoglobulinin izoelektrik pH'sıdır.

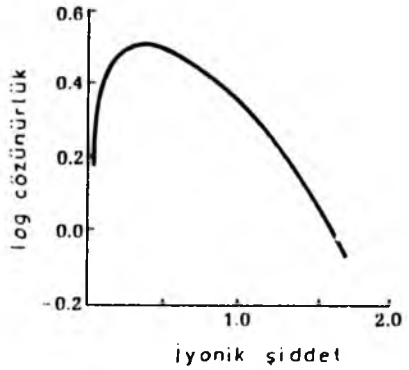


Şekil 4.17. β-Laktoglobulinin çözünürlüğüne tuz konsantrasyonu ve pH değerinin etkisi.

Değişik proteinlerin iyonlaşabilir yan gruplu amino asit muhtevaları farklı olduğundan, izoelektrik pH'ları farklıdır ve bu yüzden çok defa birbirinden izoelektrik çökelme ile ayrılabilirler. Eğer bir protein karışımının pH değeri bir komponentin izoelektrik noktasına gelirse, bu komponent fazla veya az miktarda çökelir; bu esnada bu değerin yukarısı ve aşağısındaki izoelektrik noktalı geri kalan proteinler çözeltide kalırlar. Çöken proteinler tabi konformasyonlarını muhafaza ederler; daha sonra uygun pH değerli bir ortamda tekrar çözeltiye alınabilirler.

Her protein için izoelektrik pH, ortamın iyon değişimine göre kolayca değişebilir; çünkü proteinler belirli anyon ve katyonları bağlıyabilirler. Eğer bir protein çözeltisi, H^+ ve OH^- dışındaki küçük iyonları uzaklaştırmak için saf suya karşı diyaliz edilirse, izoelektrik pH, izoiyonik pH'da gerçekleşir ve bu da her proteine göre sabittir.

Nötral tuzlarla çöktürme: Nötral tuzların proteinlerin çözünürlüğüne belli bir etkisi vardır (Şekil 4.18).



Şekil 4.18. CO-Hemoglobinin izoelektrik noktasında çözünürlüğüne K_2SO_4 nötral tuzunun etkisi. İyonik şiddet; $I = 1/2\sum C_i \times Z_i^2$ formülü ile verilmektedir.

Nötral tuzlar, düşük konsantrasyonlarda protein moleküllerinin çözünürlüğünü artırırlar (salting-in etkisi). $MgCl_2$ ve $(NH_4)_2SO_4$ gibi iki değerlikli iyonlu tuzlar, NaCl, NH_4Cl ve KCl gibi tek değerliklilerden daha etkilidir. Nötral tuzların bu özelliği, onların iyon şiddetlerine bağlıdır. Bu iyonlar protein molekülünde yan grupların ayrışmasını modifiye eder.

Yeteri kadar yüksek tuz konsantrasyonunda, bir protein bir çözeltiden hemen hemen kantitatif olarak çökeltilebilir; yani yüksek tuz konsantrasyonunda proteinlerin

çözünürliliği azalır ve hatta çökerler. Bu olaya salting-out adı verilir. Salting-out'un fizikokimyasal prensibi oldukça komplekstir; yüksek tuz konsantrasyonunda hidratasyon suyu protein molekülünden uzaklaştırılır ve böylece çözünürlük azalır. Bununla birlikte diğer faktörler de işe karışır.

Herbir protein farklı iyonik şiddetle çökelme gösterdiğinden, bu yolla proteinler birbirlerinden ayrılabilirler. Salting-out sırasında proteinler konformasyonlarını korurlar ve uygun bir ortamda tekrar çözelti fazına alınabilirler. Bu maksatla çoğunlukla suda iyi çözünüp, çok yüksek iyonik şiddet gösterebilen amonyum sülfat kullanılır.

Çözücülerle fraksiyonlama: Suda çözünebilen nötral organik çözücülerin, özellikle etanol ve asetonun ilâvesi, çoğu globuler proteinlerin sudaki çözünürlüğünü çökelme derecesine kadar azaltabilir. Bu etkinin kantitatif araştırmaları, sabit pH ve sabit iyonik şiddette çözünürlüğün ortamın dielektrik sabitinin bir fonksiyonu olduğunu göstermiştir. Etanol sudan daha küçük bir dielektrik sabitine sahip olduğundan (su için D=80 ve etanol için D=24), $F= e_1 .e_2/D.r^2$ formülüne göre (F=moleküller arası çekim kuvveti, e= yük, D=dielektrik sabiti ve r=moleküller arası uzaklık), sulu protein çözeltisine etanolun ilâvesiyle zıt yüklerin çekimi artar ve proteinler kümelenerek çökerler.

Protein karışımları, herbir komponentin değişik etanol-su veya aseton-su karışımlarında farklı çözünürlüğü esasına dayanılarak ayrılabilirler. Bu metodun bilinen bir sakıncası, bu gibi çözücülerin proteinleri yüksek sıcaklıklarda denatüre edebilmesidir; bu yüzden daima çok düşük sıcaklıklarda çalışılmalıdır.

Sıcaklığın etkisi: Globuler proteinlerin çözünürlüğüne etki eden bir 4. faktör sıcaklıktır. Çözünürlükleri 0-40°C arasında sıcaklıkla artar. 40-50°C üzerinde çözü-

nürlük azalır ve birçoğu denatüre olur. Bunun istisnaları da vardır. Proteinlerin ayrılması işlemleri daha çok düşük sıcaklıklarda gerçekleştirilir; çünkü proteinler çoğunlukla düşük sıcaklıklarda dayanıklıdırlar. Ancak bazı proteinler için, oda sıcaklığı veya hücrelerin üreme sıcaklığı daha uygundur.

4.10.c. Elektriksel Yük Esasına Dayanarak Proteinlerin Ayrılması

Proteinlerin elektriksel yüklerine göre ayrılması, polipeptid zincirlerde iyonlaşabilir yan grupların sayısı ve cinsi ile belirlenen asit-baz özelliklerine dayanmaktadır. Proteinler,amino asit bileşiminde ve dizilişinde farklılık gösterdiklerinden, her protein özel bir asit-baz davranışına sahiptir.

Proteinlerin karakteristik asit-baz özelliklerinden faydalanarak iki metot geliştirilmiştir: elektroforez ve iyon değişim kromatografisi.

Elektroforez: Elektroforez, genel olarak bileşiklerin belirli bir pH'da yük farklarına göre elektrik alanında ayrılmaları prensibine dayanır. Sistemin pH'sı tekniğin uygulandığı tampon çözelti, elektrik alanı da bir güç kaynağı tarafından sağlanır.

Yüklü bir parçacığın elektriksel bir alanda göçü, elektriksel hareketlilik formülüyle verilir:

$$\mu = \frac{V}{E}$$

Burada μ elektriksel hareketlilik, V göç hızı ve E elektriksel alan şiddetidir. μ 'nün birimi $cm^2/volt.sn$ olarak verilir. Klorür gibi küçük iyonlar için μ, $4x10^{-4}$ -$9x10^{-4}$ $cm^2/volt.sn$; proteinler için yaklaşık $0,1x10^{-4}$ -$1x10^{-4}$ $cm^2/volt.sn$ değerlerine sahiptir. Böylece proteinler, bir elektrik alanında Na^+ ve Cl^- gibi küçük iyonlardan daha yavaş göç eder; çünkü proteinlerde yükün kütleye oranı çok

daha küçüktür.

İlk olarak geliştirilen elektroforez, serbest elektroforezdir. 1937 yılında A.Tiselius tarafından geliştirilen bu elektroforezde, protein karışımı uygun bir tampon içinde çözülerek, U şeklinde bir boru içine yerleştirilmiştir. Protein çözeltisinin üzeri ise, saf tamponla doldurulmuştur. Elektrik alanının tatbiki sırasında proteinler yüklerine göre hareket ederler. Daha sonra proteinlerin konumu ve miktarı çözeltilerin kırılma indislerinin ölçülmesiyle bulunur. Uzun yıllar serbest elektroforez, kan plazma proteinleri gibi kompleks protein karışımlarının kantitatif tayininde kullanılmıştır.

Serbest elektroforez değişik şekilli bölge elektroforeziyle değiştirilmiştir. Bu elektroforez metodu çok daha basittir ve çok az nümune gerektirir. Bu metodda elektroforez, hidratize ve gözenekli bir materyalden meydana gelen sabit bir matriks üzerinde tatbik edilir. Taşıyıcı olarak çoğunlukla filtre kağıdı veya selüloz asetat şeritleri kullanılır; bunlar proteinlerle reaksiyona girmeyen veya reaksiyon sonunda geri kazanılan nisbeten inert materyallerdir. Elektroforetik proses, protein komponentleri bölgelere ayrılıncaya kadar devam ettirilir. Proteinlerin konumu ve ayrılan bölgelerdeki proteinlerin konsantrasyonları, proteinler için uygun bir renk reaktifiyle tayin edilir; konsantrasyonla orantılı olan renk intensitesi, bir dansitometre ile ölçülür. Bölge elektroforezi, serbest elektroforezden çok daha büyük ayırım sağlar. Bu metot, kan plazmasındaki esas proteinlerin miktarını tayin etmek için klinik laboratuvarlarda sıklıkla kullanılır.

Bölge elektoforezinde taşıyıcı materyal, proteinleri jel filtrasyon kromatografisindeki gibi molekül büyüklükleri esasına göre hareketlerini engelleyebilir veya dışarılayabilirse, daha büyük bir ayırım mümkündür. Bu çeşit elektroforezde, proteinler bir karışımdan elektrik yükleri ve molekül büyüklükleri esasına göre ay-

rılabilirler. Patetes nişastası ve poliakrilamid, bu amaca çok uygun materyallerdir. Basit bölge elektroforezinde kan plazma proteinleri için 5-6 band gözlenirken, bu metodla 15 veya daha fazla band ortaya konulmaktadır.

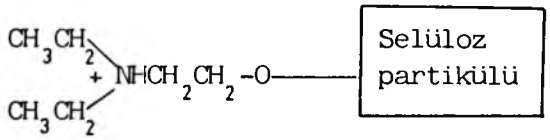
Bir başka çeşit bölge elektroforezi olan disk-elektroforezinde, diğerlerinden ayrı olarak iki farklı gözenekli jel ve iki farklı pH'lı tampon vardır. Tatbik edilen proteinler kaba gözenekli jelden küçük gözenekli jele doğru hareket ederler; bu sırada pH değişir. Sonuçta her protein çok ince, keskin bir bant oluşturur.

Elektroforetik metodlar içinde en saflaştırıcı ve en verimli olan, izoelektrik odaklama ile ayırmadır. Bu metodda önce taşıyıcı materyal üzerinde bir pH gradienti oluşturulur; daha sonra protein karışımı tatbik edilir. Bu durumda her protein izoelektrik pH'sına karşılık gelen pH gradientindeki yerine göç eder ve orada odaklanır. Bu metodla ayırım fevkalâdedir. İnsan kan plazmasının proteinleri, 40 veya daha fazla bantlar oluştururlar.

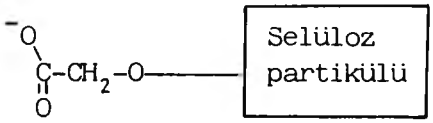
İyon değişim kromatografisi: Proteinlerin asit-baz özelliklerine dayanılarak ayırım yapılan ikinci metot, iyon değişim kromatografisidir. Bu amaçla kullanılan materyaller, çoğunlukla selülozun sentetik olarak hazırlanmış türevleridir. Dietilaminoetil selüloz (DEAE-selüloz), pH, 7,0'da pozitif yüklü gruplar ihtiva eder ve bu yüzden bir anyon değiştiricidir. Karboksimetil selüloz (CM-selüloz) ise, nötral pH'da negatif yüklü gruplar ihtiva eder ve bir katyon değiştiricidir (Şekil 4.19).

Protein karışımlarının DEAE-selüloz kolonları üzerinde ayrılmasında ve herbir komponentin sırayla elüsyonunda, azalan pH'lı tamponların bir serisi veya artan iyonik şiddetli tuz çözeltilerinin bir serisi kullanılır. Bunların kolondan geçirilmesi sırasında anyonik proteinlerin bağlanması azaltılır. Çünkü pH'nın artmasıyla birlikte, iyon değiştiriciye tutunan proteinlerin negatif

yüklü bölgeleri nötral hale gelir. Yine iyonik şiddetin



DEAE-Selüloz



CM-Selüloz

Şekil 4.19. Proteinlerin saflaştırılmasında kullanılan iyon değişim kolon maddeleri.

artmasıyla pozitif iyonlar proteinin negatif yüklü bölgelerine bağlanırlar; negatif iyonlar ise, proteinlerle iyon değiştiriciye bağlanma hususunda yarışa girerler. Böylece proteinler bu bölgeye daha yavaş bir kuvvetle bağlanırlar ve hatta koparlar. Eluatlar küçük fraksiyonlarda toplanarak gerekli analizler yapılır.

Bu metodun önemli bir tarafı da, iyon değişim kromatografisi ve jel filtrasyon kromatografisini kombine edebilmesidir. Meselâ, DEAE-Sephadex kullanılarak proteinleri yüklerine ve molekül büyüklüklerine göre ayırmak mümkündür.

4.10.d. Seçimli Adsorbsiyon Esasına Dayanarak Proteinlerin Ayrılması

Proteinler, mangal kömürü gibi apolar materyaller veya kizelgur ve alüminyum oksit gibi polar materyallere,

molekül büyüklüklerine göre adsorbe olabilirler. Bu gibi adsorbsiyonlarda proteinleri bağlayan kuvvetlerin tam çeşidi bilinmemektedir; muhtemelen apolar adsorbsiyonlarda Van der Waals ve hidrofobik etkileşmeler ve polar adsorbsiyonlarda iyonik etkileşmeler ve hidrojen köprüleri etkilidir.

Proteinlerin saflaştırılmasında, adsorbsiyon esasına göre ayırmada en çok kullanılan adsorban madde, kristal kalsiyum fosfatın bir şekli olan hidroksilapatitdir. Muhtemelen protein molekülündeki negatif yüklü gruplar, hidroksilapatitin bünyesindeki Ca^{+2} iyonlarına bağlanır. Fosfat tamponuyla proteinler, hidroksilapatit kolonundan elüe edilebilirler.

4.10.e. Spesifik Ligandları Esasına Dayanarak Proteinlerin Ayrılması

Bazı proteinler afinite kromatografisi vasıtasıyla çok kere bir basamakta çok kompleks bir karışımdan izole edilebilirler. Afinite kromatografisi bir çeşit adsorbsiyon kromatografisi olup, saflaştırılması istenen molekülün, matriks adı verilen bir kolon maddesine kovalent olarak immobilize edilmiş bir komplamenter bağlanma bileşiğine (ligand) spesifik ve tersinir bağlandığı bir tekniktir. Matriks olarak Sephadex, Sepharose ve Biogel gibi farklı jeller kullanılabilir. Kullanılacak ligandın saflaştırılacak madde için spesifik ve tersinir bağlama afinitesi olmalıdır. Tablo 4.4'de afinite kromatografisinin en çok kullanıldığı biyolojik sistemler gösterilmiştir.

Küçük ligandları (enzim inhitörleri gibi) doğrudan matrikse bağlamak suretiyle hazırlanan adsorbanlar, matriks ile liganda bağlanan maddeler arasında sterik engellemelerden dolayı küçük ayırma kapasitesi gösterebilirler. Bu durumlarda uzantı kolları, etkili bağlamayı kolaylaştırmak için matriksle ligand arasına sokulurlar.

Tablo 4.4. Afinite kromatografisinin en çok uygulandığı biyolojik sistemler.

Saflaştırılacak madde	Ligand
Enzim	Substrat, inhibitör, kofaktör.
Antikor	Antijen, virüs, hücre.
Lektin	Polisakkarit, glikoprotein, hücre yüzey reseptörü, hücre.
Nükleik asit	Komplamenter baz dizisi,histon, nükleik asit polimeraz, bağlayıcı protein.
Hormon	Reseptör protein.
Vitamin	Taşıyıcı protein.
Hücre	Hücre yüzeyi spesifik proteini, lektin.

4.11. PROTEİNLERİN MOLEKÜL AĞIRLIKLARININ TAYİNİ

Belirli bir protein yüksek bir saflıkta elde edildikten sonra bazı özellikleri belirlenmelidir. Bu maksatla toplam molekül ağırlığı, polipeptid zincir sayısı, polipeptid zincirlerinin molekül ağırlığı, amino asit bileşimi ve dizilişi analizleri yapılmalıdır. Burada proteinlerin ve alt birimlerinin molekül ağırlıkları tayininde kullanılan metodların prensipleri kısaca izah edilecektir.

Proteinin kimyasal bileşiminden molekül ağırlığının bulunması: Bir proteinin minimum molekül ağırlığı o proteinin herhangi bir elementten bir atom ihtiva ettiği farzedilerek bulunur. Bu metod bir metal atomu ihtiva eden proteinler için kullanılır. Meselâ miyoglobin yüzde 0,335 demir bileşimine sahiptir. Bu molekülün minumum molekül ağırlığı

$$M_{min} = \frac{\text{Fe'nin atom ağır.}}{\text{Yüzde Fe}} x100 = \frac{56}{0,335} x100 = 16700$$

Buradan gerçek molekül ağırlığı, n sayısıyla çarparak bu-

lunur; n, molekül başına ihtiva edilen Fe atomu sayısıdır. Miyoglobin için 1 olduğundan, gerçek molekül ağırlığı 16700'dür. Hemoglobin de yüzde 0,335 oranında Fe bileşimine sahiptir. Herbir molekül 4 adet Fe atomu ihtiva ettiğinden hemoglobinin molekül ağırlığı 4x16700= 66800 olarak bulunur.

Osmotik basıncın ölçümüyle molekül ağırlığı tayini: Molekül ağırlığı ile osmotik basınç arasında $M=c/\pi RT$ ifadesiyle gösterilen bir münasebet vardır. Burada M molekül ağırlığı, c gram /lt cinsinden konsantrasyon, π ölçülen osmotik basınç, R gaz sabiti ve T mutlak sıcaklıktır. Değişik protein konsantrasyonlarında π bulunur ve hesaplanan M, konsantrasyona karşı grafiğe çizilir. Osmotik basınç ideal çözeltilerin bir özelliği olduğundan ve idealliğe çok küçük konsantrasyonlarında erişebildiğinden, grafikteki eğri C=0 değerine ekstrapolasyonla uzatılarak gerçeğe çok yakın M değeri bulunur.

Sedimentasyon metodu ile molekül ağırlığı tayini: İlk defa 1925 yılında T.Svedberg tarafından keşfedilen ultrasantrifüjün kullanılmasıyla gerçekleştirilen bu metodda, moleküller yer çekiminin 500.000 kadar misli bir kuvvetle itilmektedirler. Proteinlerin hareket hızı şekillerine, büyüklüklerine olduğu kadar çözündükleri ortamın yoğunluk ve vizkozitesine de bağlıdır. Bu faktörler arasındaki münasebet

$$M = \frac{RTS}{D(1-v.d)}$$

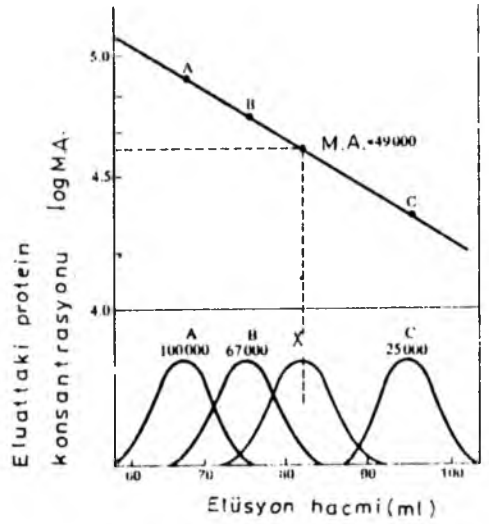
denklemiyle gösterilir. Burada M molekül ağırlığı, R gaz sabiti, T mutlak sıcaklık, D difüzyon katsayısı, v proteinin kısmi spesifik hacmi, d çözeltinin yoğunluğu ve S de proteinin sedimentasyon katsayısıdır. D katsayısı saf çözücüdeki difüzyonla, v de 1 g katı proteinin çözücü hacmında meydana getirdiği değişiklikle bulunurken, sedimentasyon katsayısı ultrasantrifüjde proteinin hareket

hızından elde edilir. Aynı şekil ve ağırlıktaki protein molekülleri aynı hızla hareket ederken, belirli bir band oluştururlar. Bu bantların Schlieren mercek sistemi vasıtasıyla refraktif indexlerinde hasıl olan değişme gözlenir ve sedimentasyon katsayısı

$$S = \frac{dx}{dt} \times \frac{1}{w^2 x}$$

formülünden hesaplanır. Burada x dönüş merkezinden uzaklığı, w saniyede radyan cinsinden açısal hızı, dx/dt oranı da bantların hareket hızını göstermektedir. Proteinler için S değeri, $1x10^{-13}$ - $200x10^{-13}$ saniye arasındadır. 1 Svedberg birimi 10^{-13} saniyelik katsayıya eşit olduğundan, $5x10^{-13}$ saniyelik bir S değeri 5S olarak gösterilir.

Jel filtrasyon kromatografisi vasıtasıyla molekül ağırlığı tayini: Son yıllarda proteinlerin molekül ağırlıkları tayininde çok kullanılan ve çok basit aletlerle gerçekleştirilen bir metoddur. Özellikle globuler proteinlerde başarı ile kullanılmaktadır. Bu metodda proteinler, 4.10.a'da anlatıldığı şekilde kromatografi işlemine tabi tutulurlar. Küresel proteinlerin kolondan geldiğini gösteren 280 nm deki absorbansa karşılık gelen elüsyon tampon hacmi ile proteinin molekül ağırlığı arasında bir münasebet vardır. Önce kolondan molekül ağırlıkları bilinen saf küresel proteinler akıtılarak bir standart grafik elde edilir. Bu grafik, 280 nm de maksimum absorbansın elde edildiği tüp sayısına karşı molekül ağırlığının logaritmasının çizilmesiyle hazırlanır. Daha sonra molekül ağırlığı bilinmeyen proteinin kaçıncı tüplerde geldiği bulunur ve grafikten molekül ağırlığı tayin edilir (Şekil 4.20). Bu metodun en önemli avantajlı yönü, molekül ağırlığı tesbit edilmek istenen proteinin saf halde olması gerekmemesidir. Ancak proteinin hangi fraksiyonda geldiğini belirleyen bir metod olmalıdır.



Şekil 4.20. Jel filtrasyon kromatografisi metoduyla molekül ağırlığı tayini.

Sodyum dodesil sülfat (SDS) elektroforezi: Burada proteinler normal elektroforez işlemine tabi tutulurlar. Farklı olarak elektroforez tamponu % 1 oranında SDS ihtiva ederken, molekül ağırlığı tayin edilecek protein ve molekül ağırlıkları bilinen standart proteinler SDS'de çözünürler. Standart proteinler ve bilinmeyen protein, poliakrilamid jelin tepesine konur ve elektrik akımına maruz bırakılır. Proteinlerin hareket hızı normal elektroforezde olduğu gibi yük ve kütle yerine yalnız kütlelerine bağlıdır. Çünkü proteine yapışmış SDS üzerindeki negatif yük proteinin kendi yükünden kat kat fazladır. Elektroforez sonrası oluşan bantlar Coomasse blue boyasıyla boyanır. Standart proteinlere göre başlangıç noktasından aldıkları yollar karşılaştırılarak bilinmeyen proteinin molekül ağırlığı bulunur. Bu metodla birden fazla alt birimden oluşan proteinler alt birimlerine ayrılır ve elektroforez sonucu her polipeptid zinciri için ayrı bantlar teşekkül eder. Alt birimlerin toplam kütlesi de proteinin molekül ağırlığını verir. SDS-elektroforezi molekül ağırlığının tayininde son 10 yılda en çok başvurulan metoddur.

5.BÖLÜM: E N Z İ M L E R

Enzimler, canlı organizmalardaki kimyasal reaksiyonları hızlandıran ve hiçbir yan ürünün oluşmasına fırsat vermeden % 100'lük bir ürün verimi sağlayan biyolojik katalizörlerdir. Proteinlerin en büyük ve en çok özelleşmiş grubunu teşkil ederler.

Biyokimya tarihinde araştırmaların büyük çoğunluğunu enzimler üzerindeki çalışmalar oluşturmuştur. Kataliz olayı ile ilgili ilk önemli denemeler 1760-1825 yılları arasında midedeki enzimatik sindirim üzerinde yapılmıştır. Belirli bir enzim üzerindeki ilk çalışmayı 1835 yılında bir İsveçli kimyager olan S.S.Berzelius gerçekleştirmiş, diastazın nişastayı "in vivo"* olarak sülfürik asitten daha yüksek verimde hidrolizlediğini göstermiştir. 1860 yılında L.Pasteur fermentasyon olayının enzimlerce yürütüldüğünü deneylerle isbat etmiş, bu yüzden enzimler için "ferment" terimi kullanılmaya başlanmıştır. Fakat Pasteur enzimlerin yalnız sağlam hücre yapısı içinde görev yapabildiklerini zannetmişti.

Enzimoloji alanında şüphesiz en önemli gelişme, 1926 yılında J.B.Sumner'in üreaz enzimini "Jack bean" bitkisinden elde edip, kristallendirdikten sonra protein yapısında bir bileşik olduğunu ortaya koymasıdır. Önceleri şüphe ile karşılanan bu sonuç, 1930-36 yılları arasında J.Northrop'un pepsin, tripsin ve kimotripsin enzimlerini kristallendirmesi ve protein yapısında olduklarını kesin olarak ortaya koymasıyla doğrulanmıştır.

Bugün yaklaşık 2000 kadar enzim tanımlanmış, birçoğu saf halde elde edilip kinetikleri incelenmiş ve 200'den fazlası da kristallendirilmiştir. Ancak yapılan genetik çalışmalar daha tesbit edilememiş birçok enzimin varlığını göstermektedir.

---

* İn vivo=Canlı yapı içinde,sağlam hücre içinde.
İn vitro=Hücre dışında, tüpte.

5.1. ENZİMLERİN SINIFLANDIRILMASI

Enzimler, önceleri katalitik etkilerini üzerinde gösterdikleri ve "substrat" adı verilen bileşiklerin isimlerinin sonuna, "az" eki getirilerek ayırdediliyorlardı. Meselâ üreyi CO_2 ve NH_3'e parçalayan enzime üreaz, arginini ornitin ve üreye parçalayan enzime arginaz, fosfat esterlerinin hidrolizlenmesini katalizleyen enzimlere de fosfataz deniliyordu. Bu isimler en azından substratlar hakkında bilgi verirlerken, bu hususta hiçbir malumat ifade etmiyen bazı enzim adları da biyokimyacılar tarafından kullanılmaktaydı. Meselâ pepsin, tripsin, katalaz gibi. Zamanla birçok enzimin daha ortaya çıkarılması sonucu sistematik bir isimlendirilmeye ihtiyaç duyuldu. Bunun üzerine enzimler, uluslararası enzim komisyonu tarafından katalizledikleri reaksiyon tipleri ve reaksiyon mekanizmalarına göre bir tasnife tabi tutuldular. Fakat bugün birçok biyokimyacı tarafından geleneksel isimler hala kullanılmakta, sistematik isimleri de genellikle parantez içinde verilmektedir.

Sistematik isimlendirmenin başlıca özellikleri şunlardır:

I.Reaksiyonlar ve onları katalizleyen enzimler 6 gruba bölünmüştür. Herbir grup da kendi içinde 4 ile 13 arasında alt gruba ayrılmıştır. Sözü edilen 6 grup birtakım örnekleriyle aşağıda verilecektir.

II.Enzim adı iki kısımda verilir. İsmin ilk bölümü substrat veya substratlarındır. İkincisi ise katalizlenen reaksiyonun tipinin sonuna "-az" eki getirilmiş hali, yani grup veya alt grup adıdır. Substratlar aralarına iki nokta konularak yazılırlar.

III.Reaksiyonun tabiatını açıklayacak ifadeler gerekiyorsa, parantez içinde ismin sonuna yazılabilir. Meselâ,

$$\text{L-malat} + NADP^+ \rightleftharpoons \text{piruvat} + CO_2 + NADPH+H^+$$

reaksiyonunun bir dekarboksilasyon reaksiyonu olduğunu belirtmek için enzim adı; L-malat:$NADP^+$ oksidoredüktaz (dekarboksile eden) şeklinde yazılır.

IV.Her enzime bir sistematik kod numarası verilmiştir. Bu numara E.C.(Enzyme Code) harflerinden sonra ardarda gelen dört rakamdan ibarettir. Birinci rakam enzimin bağlı olduğu grubu gösterirken, ikincisi alt grubu, üçüncüsü alt alt grubu belirtir. Dördüncü rakam ise, enzimin aynı üç rakama sahip enzimler arasındaki sırasını verir. Meselâ E.C.2.7.1.1. kod numarasında 2, bu enzimin bir transferaz enzimi olduğunu; 7, bir fosfat grubu transfer edildiğini; 1, fosfat transferinin alkol grubuna olduğunu ve son 1 rakamı da bu enzimin alkol grubuna fosfat transferi sağlayan enzimler arasında ilk sırayı aldığını göstermektedir. Sözü edilen enzim hekzokinaz geleneksel adıyla bilinen, ATP:D-heksoz-6-fosfotransferaz enzimidir.

Enzimlerin ayrıldıkları 6 ana grup, bazı örnekleriyle şunlardır:

1.Oksidoredüktazlar: 2 substrat arasındaki redoks reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir. Substratlara S ve S'denilirse, olay

$$S_{ind} + S'_{yük} \rightleftharpoons S_{yük} + S'_{ind}$$

genel reaksiyonuyla gösterilebilir. Bu büyük ve önemli grup, dehidrogenazlar veya oksidazlar diye bilinmektedir. $\diagup CH\text{-}OH$, $\diagup CH=CH\text{-}$, $\diagup C=O$, $\diagup CH\text{-}NH_2$ ve $\diagup CH\text{-}NH\text{-}$gruplarının indirgenme ve yükseltgenmelerini katalizleyen enzimler bu sınıftandır.

Örnek:

$Alkol + NAD^+ \rightleftharpoons$ Aldehid veya keton $+ NADH + H^+$

Eski adı: Alkol dehidrogenaz

Sistematik adı: Alkol:NAD^+ oksidoredüktaz

E.C.1.1.1.1.

2.Transferazlar: İki substrat arasında hidrojen dışındaki grupların transferini katalizleyen enzimlerdir. Taşınan gruba G denilirse,

$$S\text{-}G + S' \rightleftharpoons S + S'\text{-}G$$

genel reaksiyonu yazılabilir.

Örnek:

Asetil-CoA+Kolin $\rightleftharpoons$ CoA+O-Asetil kolin

Eski adı: Kolin açil transferaz

Sistematik adı: Asetil-CoA: kolin O-asetil transferaz

E.C.2.3.1.6.

3.Hidrolazlar: Ester, eter, peptid, glikozid, asid anhidrid, C-C, C-halojenür veya P-N bağlarının bir H_2O molekülünün katılmasıyla hidrolizini katalizleyen enzimlerdir.

Örnek:

Asetil-kolin+H_2O $\rightleftharpoons$ Asetik asit+ Kolin

Eski adı: Asetil-kolin esteraz

Sistematik adı: Asetil kolin asetil-hidrolaz

E.C.3.1.1.8.

4.Liyazlar: Hidrolizden farklı bir mekanizma ile substratlardan grupların uzaklaştırılıp, çift bağların oluşturulduğu reaksiyonları katalizleyen enzimlerdir. Genel manada reaksiyonları,

$$-\overset{X}{\underset{|}{C}}-\overset{Y}{\underset{|}{C}}- \rightleftharpoons >C=C< + X\text{-}Y$$

şeklinde gösterilebilir.

Örnek:

$HCO_3^- + H^+ \rightleftharpoons H_2O + CO_2$

Eski adı: Karbonik anhidraz

Sistematik adı: Karbonat hidroliyaz

E.C.4.2.1.1.

5. İzomerazlar: Geometrik, optik veya yapısal izomerlerin birbirine dönüştürülmesini katalizleyen enzimlerdir.

Örnek:

D-Gliseraldehid-3-fosfat $\rightleftharpoons$ Dihidroksi aseton fosfat

Eski adı: Trioz fosfat izomeraz

Sistematik adı:D-Gliseraldehid-3-fosfat ketolizomeraz

E.C.5.3.1.1.

6.Ligazlar: ATP ve GTP gibi yüksek enerjili fosfat bileşiklerinden fosfat bağının kopması sonucu ortaya çıkan enerji yardımıyla iki bileşiğin bağlanması reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir.

Örnek:

ATP+L-Glutamat+NH_4^+ $\rightleftharpoons$ ADP +PO_4^{-3} +L-Glutamin

Eski adı: Glutamin sentetaz

Sistematik adı: L-Glutamat: NH_4^+ ligaz (ADP)

E.C.6.3.1.2.

5.2. ENZİM KOFAKTÖRLERİ

Diğer proteinler gibi enzimler de basit ve bileşik olarak sınıflandırılabilirler. Bazı enzimler katalizleme fonksiyonlarını yalnız protein yapılarıyla yerine getirebilirken, bazıları da protein yapısında olmayan "kofaktör" adı verilen gruplara ihtiyaç duyarlar. Kofaktör bir metal iyonu olabildiği gibi, "koenzim" denilen kompleks bir organik bileşik te olabilir. Bazen aktivite için ikisi de gerekebilir. Enzimler sıcaklıkla denatüre olurken, kofaktörler ısıya mukavimdirler. Katalitik olarak aktif olan enzim-kofaktör kompleksine holoenzim adı verilir. Kofaktörsüz proteine ise apoenzim denilir. Apoenzim, katalitik olarak inaktiftir. Kofaktörlü enzimlerin, bu bileşik veya metal iyonlarına karşı farklı derecelerde afiniteleri vardır. Çok defa bu kofaktörler diyalizle uzaklaştırılabilir. Fakat bazı enzim-kofaktör bağlanma-

ları kovalent yapıda veya diyalizle uzaklaştırılamıyacak kadar sıkıdır. Böyle kofaktörlere "prostetik grup" adı verilir. Meselâ "sitokrom c"deki "hem" grubu enzimin peptid zincirine kovalent bir bağla bağlıdır. Enzime gevşek olarak bağlanmış koenzimlerle enzim arasındaki etkileşmeler enzim-substrat etkileşmelerine benzer. Reaksiyonlardan sonra enzimlerden ayrılarak bir başka metabolizma olayında yer alabilirler.

Tablo 5.1'de kofaktör olarak metal iyonlarını kullanan enzimler sıralanmıştır. Bu enzimlerde metal iyonlarının iki çeşit fonksiyonu vardır. Birincisi; substrat ve enzim arasında köprü vazifesi görerek koordinasyon kompleksi teşekkülüyle birbirine bağlar. İkinci olarak kendisi katalitik bir fonksiyon görür. Meselâ katalaz enziminin demir atomları, hidrojen peroksidin parçalanmasında katalitik merkez vazifesini yüklenmiştir. Aynı özelliği demir tuzları da H_2O_2 'nin bozunması reaksiyonunda göstermektedir. Fakat bu özellik enzimin protein kısmı tarafından daha da artırılmıştır.

Tablo 5.1. Kofaktör olarak metal iyonu ihtiva eden bazı enzimler.

Zn^{+2}	Fe^{+2} veya Fe^{+3}
Alkol dehidrogenaz	Sitokromlar
Karbonik anhidraz	Peroksidaz
Karboksi peptidaz	Katalaz
Mg^{+2}	Ferrodoksin
Fosfohidrolazlar	Cu^{+2} (Cu^{+})
Fosfotransferazlar	Tirozinaz
	Sitokrom oksidaz
Mn^{+2}	K^{+}
Arginaz	Piruvat fosfokinaz (Mg^{+2} de gerekir.)
Fosfotransferazlar	Na^{+}
	Plazma membran ATP-azı (Mg^{+2} ve K^{+} iyonları da gerekir.)

Tablo 5.2'de de bilinen önemli koenzimler ve onların görev aldıkları reaksiyon tipleri verilmiştir. Koenzimler umumiyetle elektronlar, belirli atom veya fonksiyonel grupların transferini gerçekleştirirler. Koenzimlerin birçoğu tiamin, lipoik asit, riboflavin, pantotenik asit, nikotin amid gibi vitaminleri yapılarının aktif bir parçası olarak ihtiva ederler. B vitaminlerini teşkil eden bu bileşikler hayvan organizmaları tarafından sentezlenemediğinden diyetle alınmaları gerekir.

Tablo 5.2. Grup transferini gerçekleştiren koenzimler

Koenzim	Taşınılan birim
Nikotin amid adenin dinükleotid (NAD^+)	Hidrojen atomları (elektronlar)
Nikotin amid adenin dinükleotid fosfat($NADP^+$)	Hidrojen atomları (elektronlar)
Flavin mono nükleotid (FMN)	" " "
Flavin adenin dinükleotid (FAD)	" " "
Koenzim Q (CoQ)	" " "
Tiamin pirofosfat (TPP)	Aldehidler
Koenzim A (CoA)	Açil grupları
Lipoamin	" "
Kobaamid koenzimleri	Alkil grupları
Biyositin	CO_2
Piridoksal fosfat	Amino grupları
Tetrahidrofolat koenzimleri	Metil, metilen, formil, veya formimino grupları

5.3. ENZİM KİNETİĞİ

Enzim kinetiği, enzimler tarafından katalizlenen reaksiyon hızlarının incelendiği bir konudur. Kimyasal kinetiğin temel prensipleri burada da geçerlidir. Gerçi kimyasal kinetik, reaksiyon hızlarının kantitatif incelenmesini kapsamasının yanısıra reaksiyonların mekanizmalarıyla da ilgilenir. Fakat enzim kinetiğinde biz daha ziyade biyokimyasal reaksiyon hızlarının kantitatif incelenmesini yapacağız ve buna etki eden faktörleri de ele

alacağız. Konuya girmeden önce kimyasal kinetiğin ve kataliz olayının bazı prensiplerini hatırlatacağız.

5.3.a. Kimyasal Kinetik

Kimyasal reaksiyonlar, ürünleri oluşturmak üzere birbirleriyle etkileşen reaktantların sayılarına göre sınıflandırılırlar. Bir, iki veya üç reaktantın ürünleri meydana getirdiği reaksiyonlar bu yüzden sırasıyla monomoleküler, bimoleküler veya termoleküler olarak isimlendirilirler.

Kimyasal reaksiyonlar aynı zamanda reaksiyon mertebelerine göre sınıflandırılabilir. Sıfırıncı, birinci, ikinci ve üçüncü mertebe reaksiyonlar bize reaksiyon hızlarına kaç çeşit reaktant konsantrasyonunun tesir ettiğini gösterir.

Birinci mertebe reaksiyonların hızları yalnız bir çeşit reaktantın konsantrasyonuyla doğru orantılıdır. En basit örnek olarak A $\longrightarrow$ P reaksiyonunu ele alırsak, reaksiyon hızı A'nın kaybolma veya P'nin oluşma hızıyla orantılıdır. Burada herhangi bir t anındaki reaksiyon hızı ifadesi

$$\frac{d[P]}{dt} = -\frac{d[A]}{dt} = k\,[A]$$

ile verilir. Burada k, hız sabiti olup, sıcaklıkla değişen bir değerdir. Bu ifadenin integrali alınıp, logaritma da 10 tabanına göre yazılırsa

$$\log \frac{[A_o]}{[A]} = \frac{k.t}{2{,}303}$$

denklemi çıkar. Burada $[A_o]$, A'nın t=0 daki, $[A]$ da herhangi bir t anındaki değeridir.

İkinci mertebe reaksiyonların hızları da iki reaktantın konsantrasyonuna veya bir reaktant konsantrasyonunun ikinci kuvvetine bağlıdır. Buna örnek olarak

(1) $A + B \longrightarrow P$ veya (2) $2A \longrightarrow P$ reaksiyonlarını gösterebiliriz. Bunların hız ifadeleri ise, (1) $\frac{d[P]}{dt} = -\frac{d[A]}{dt} = -\frac{d[B]}{dt} = k[A][B]$

$$(2)\ \frac{d[P]}{dt} = -\frac{1}{2}\frac{d[A]}{dt} = k[A]^2$$

şeklinde verilir.

Burada örnek olarak alınan $A + B \longrightarrow P$ reaksiyonu her zaman ikinci mertebe olmayabilir. Bazı durumlarda birinci mertebe davranışı gösterebilir. Meselâ A'nın konsantrasyonu çok yüksek ve B'ninki düşük ise, bu bimoleküler reaksiyonun hızı yalnız B'nin konsantrasyonuna bağlıdır ve reaksiyon birinci mertebededir. Buradan reaksiyon mertebesinin, reaksiyonun vukubulduğu şartlara bağlı olup, doğrudan doğruya reaktant sayısından çıkarılamayacağı sonucuna varılmaktadır.

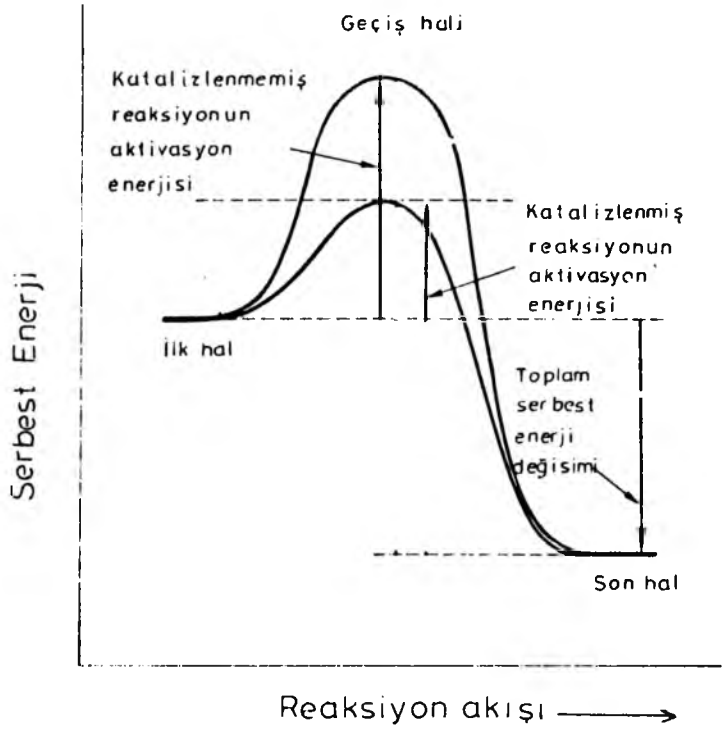
Üçüncü mertebe reaksiyonlarına nadiren rastlanır. Hızları üç konsantrasyon terimine bağlıdır. Bazı kimyasal reaksiyon hızları herhangi bir reaktant konsantrasyonuna bağlı değildir. Bu tip reaksiyonlar "sıfırıncı mertebe"-dedir. Birçok katalizörlü reaksiyonlar bu tiptendir.

5.3.b. Kataliz Olayı

Şimdi $A \longrightarrow P$ reaksiyonunu ele alalım. Burada A moleküllerinden yüksek enerjili olanlar, yani aktifleşmiş durumdakiler hemen gerekli bağ teşekkülü veya parçalanmasıyla ürüne (P'ye) dönüşürler. Kısaca, reaksiyona giren maddelerin ürünlere çevrilmeleri için bir enerji engelini aşmaları gerekmektedir. Bu enerji engeline "aktifleşme enerjisi" denir ve belli sıcaklıkta 1 mol reaktantın aktifleşmiş durumu kazanmaları için gerekli enerji miktarı olarak tarif edilir.

Her kimyasal reaksiyonda aktifleşme engelinin üst noktasına tekabül eden bir "geçiş hali" veya "geçiş komp-

leksi" adı verilen ve etkileşen moleküllerin enerjice zengin hallerini gösteren durum vardır (Şekil 5.1).



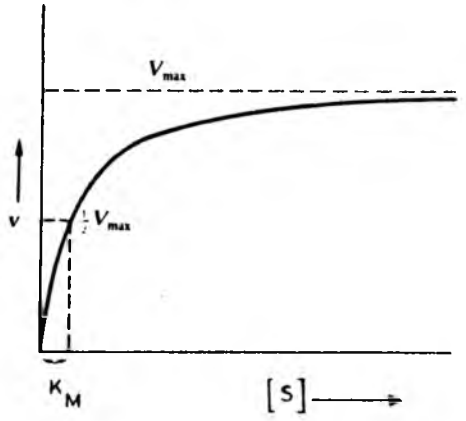
Şekil 5.1. Bir kimyasal reaksiyonun katalizlenmiş ve katalizlenmemiş halleri için enerji diyagramı.

Reaksiyon hızı geçiş kompleksi konsantrasyonuyla orantılıdır. Sıcaklığın yükseltilmesi, termik hareket ve enerjiyi artıracağından, geçiş kompleksi konsantrasyonu yükselecek ve bunun sonucu olarak ta reaksiyon hızlanacaktır.

Katalizörlerin reaksiyon hızları üzerindeki etkileri aktivasyon enerjisini azaltmak şeklindedir. Reaktantlarla daha düşük enerjili bir geçiş kompleksi oluşturarak daha çok sayıda ürünün teşekkülünü sağlarlar (Şekil 5.1). Reaksiyondan sonra da katalizörlerde hiçbir değişiklik olmaz.

5.3.c. Enzimlerin Katalizlediği Reaksiyonların Kinetiği

Kimyasal reaksiyon kinetiği genel prensiplerinin enzimli reaksiyonlarda da uygulandığını daha önceden belirtmiştik. Bununla beraber bu reaksiyonlarda farklı özellikler vardır. Bu da enzimlerin substrata "doyma" olayıdır. Şekil 5.2'de enzimli bir reaksiyon hızının substrat konsantrasyonuyla değişimi gösterilmektedir. Düşük substrat konsantrasyonunda, reaksiyon hızı substrat konsantrasyonuyla orantılı olarak artar, yani reaksiyon substrata göre birinci mertebedendir. Substrat konsantrasyonu artırıldığı zaman, reaksiyon hızı artışında bir azalma gözlenir ve bu bölümde reaksiyon sıfırıncı ile birinci mertebeler arasında karışık bir mertebeye sahip olur. Substrat daha da artırıldığında hız sabitleşir ve substrat konsantrasyonuyla değişmez. Bu bölümde reaksiyon sıfırıncı mertebededir ve bütün enzim molekülleri substratla birleşmiş, yani doymuş haldedir. Bütün enzimler sözü edilen doygunluk özelliğini gösterirler. Ancak herbirisinin bu hale erişebilmeleri farklı substrat konsantrasyonlarında mümkün olur.



Şekil 5.2. Enzimatik olarak katalizlenen bir reaksiyonun hızına substrat konsantrasyonunun etkisi.

Enzimlerin biyolojik katalizörler olduğunu biliyo-

ruz. Kimyasal katalizörlerin reaktantlarla daha düşük enerjili geçiş kompleksleri oluşturduğunu görmüştük. Enzimler de substratlarıyla ve bazen de koenzimleriyle kompleksler oluştururlar (ES ile gösterilir). Doygunluk durumunda ortamdaki bütün enzim ES halindedir.

1913 yılında Leonor Michaelis ve Maud Menten, enzimli reaksiyonların ilk basamağında bir ES oluşmasından ve enzimlerin doygunluk özelliğinden çıkarak, Şekil 5.2'-deki eğriyi verecek bir model geliştirdiler. Bu model birçok enzimin kinetik özelliğini açıklamada başarılı olmuştur. Michaelis ve Menten, enzimli bir reaksiyonu

$$E + S \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{k_3} E + P \quad (1)$$

denklemleriyle gösterdiler. Buna göre; E enzimi ve S substratı k_1 hız sabiti ile ES enzim-substrat kompleksi oluşturmaktadır. ES kompleksinin iki akibeti vardır: Ya k_2 hız sabiti ile tekrar E ve S'ye ayrışacak veya k_3 hız sabiti ile ürüne (P) dönüşecektir. Burada ürünün tekrar ES kompleksine dönüşemeyeceği farzedilmektedir. Ürün konsantrasyonunun ihmal edilebilecek seviyede olduğu başlangıç durumunda, bu faraziye tamamen doğrudur. Yukarıdaki reaksiyonda ürünün teşekkül hızı

$$v = \frac{d[P]}{dt} = k_3 [ES]$$

eşitliği ile verilir. Burada ES terimini enzim ve substrat konsantrasyonları gibi bilinen değerler cinsinden göstermemiz gerekmektedir. ES'nin oluşma ve parçalanma hızlarını

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1 [E]\ [S] \quad (2)$$

$$-\frac{d[ES]}{dt} = k_2 [ES] + k_3\ [ES] \quad (3)$$

denklemleri vermektedir. ES kompleksi konsantrasyonunun reaksiyon boyunca nisbeten sabit kaldığı, yapılan spektroskopik çalışmalarda bulunmuştur. Bu da ES kompleksi oluşma hızının parçalanma hızına eşit olmasıyla mümkündür. Böylece

$$-\frac{d[ES]}{dt} = \frac{d[ES]}{dt} \text{ 'den}$$

$$k_1 [E][S] = (k_2 + k_3)\,[ES] \qquad (4)$$

eşitliği çıkar. 4'ten [ES] 'yi çekip bir düzenleme yaparsak

$$[ES] = \frac{[E][S]}{(k_2 + k_3)/k_1} \qquad (5)$$

bulunur. 5 eşitliğindeki sabitleri tek bir terimde toplamak için, $K_M = (k_2 + k_3)/ k_1$ yazarız. Burada K_M'ye Michaelis sabiti adı verilir. Bu sabit yerine konulduğunda

$$[ES] = \frac{[E][S]}{K_M} \quad \text{çıkar.} \qquad (6)$$

(6) eşitliğinde payda bulunan [E] ve [S] terimlerini inceleyelim: Burada herhangi bir andaki S konsantrasyonunu başlangıçtaki ile aynı alabiliriz. Çünkü enzim konsantrasyonu substrat konsantrasyonundan pekçok defa küçük olduğundan reaksiyon boyunca S konsantrasyonunun değişmediğini kabul edebiliriz. Fakat serbest haldeki enzim konsantrasyonu ([E]), toplam enzim konsantrasyonu ($[E_T]$) ile [ES] arasındaki farka eşittir. Yani,

$$[E] = [E_T] - [ES] \qquad (7)$$

Bu ifadeyi (6) eşitliğinde [E] 'nin yerine koyarsak

$$[ES] = \frac{([E_T] - [ES])\,[S]}{K_M} \qquad (8)$$

elde edilir. (8) denklemini [ES] için çözdüğümüzde

$$[ES] = [E_T]\,\frac{[S]}{[S] + K_M} \qquad (9)$$

eşitliği çıkar. $v=k_3\ [ES]$ denkleminde $[ES]$ yerine (9) denkleminin sağ tarafı konursa,

$$v=k_3\,[E_T]\,\frac{[S]}{[S]+K_M} \qquad (10)$$

elde edilir. $[E_T]=[ES]$ doygunluk halinde reaksiyon maksimum hızla yürür. Öyle ise

$$V_{max} = k_3\,[E_T] \qquad (11)$$

olacaktır. 11'i 10'da yerine koyduğumuz zaman

$$v=\frac{V_{max}\,[S]}{[S]+K_M} \qquad (12)$$

eşitliği elde edilir. Bu eşitliğe Michaelis-Menten denklemi adı verilir ve Şekil 5.2'deki eğrinin kinetik özelliklerini ifade eder. Düşük substrat konsantrasyonlarında $K_M \gg [S]$ olacağından, $[S]$ ihmal edilir ve

$$v=\frac{V_{max}}{K_M}\,[S] \qquad (13)$$ doğru denklemi

elde edilir. Şekil 5.2'deki eğrinin başlangıç kısmı 13 denklemindeki bu hız-substrat konsantrasyonu münasebetini göstermektedir. $[S] \gg K_M$ olduğu yüksek substrat konsantrasyonunda 12'deki K_M ihmal edilir ve $v= V_{max}$ olur. Burada bütün enzim substratla doymuş ve artan $[S]$ ile hız değişmiyen bir sabit maksimum hıza ulaşmıştır.

Şimdi özel bir durum ele alalım: Hızın $V_{max} / 2$ olduğu durumda, değerleri Michaelis-Menten eşitliğinde yerine koyarsak,

$$\frac{V_{max}}{2} = \frac{V_{max}\,[S]}{K_M+[S]}$$

$[S]= K_M$ sonucunu elde ederiz. Buradan K_M sabitinin tarifini, "maksimum hızın yarısına erişildiği substrat konsantrasyonu" olarak çıkarabiliriz. Birimi de mol/lt dir.

Michaelis-Menten denklemi enzimatik etkinin kantitatif incelenmesinde bütün enzimler için temel bir ifadedir. Fakat birçok enzimler, bu eşitliği çıkartırken

kabul ettiğimiz bazı ideal şartlara uymayabilirler. Meselâ birden fazla enzim-substrat kompleksinden sonra ürün oluşabilir. Yani,

$$E + S \rightleftharpoons ES \rightleftharpoons EZ \rightleftharpoons EP \longrightarrow E + P$$

basamakları sonucunda katalizleme vuku bulur. Bundan başka bazı reaksiyonlarda iki veya daha çok sayıda substrat olabilir. Böyle bir durumda ES_1 , ES_2 ve ES_1S_2 gibi üç ayrı enzim-substrat kompleksi teşekkül edebilir. Bu tip enzim reaksiyonlarının kinetik analizi çok karmaşıktır ve çözümlerinde bilgisayarlardan istifade edilir. Bununla beraber bütün enzimlerin kinetiğinin analizinde başlangıçta Michaelis-Menten eşitliğinden yararlanılır.

5.3.d. K_M VE V_{max} Değerlerinin Önemi

Enzimlerin K_M değerleri çok farklılık gösterir (Tablo 5.3). Birçok enzimler için bu değer 10^{-1} ile 10^{-6} M arasındadır. K_M değeri enzim konsantrasyonuna bağlı değildir. Substratın yapısı, pH, sıcaklık ve iyonik şiddetle değişebilir. Birden fazla substrata sahip enzimlerde, her substrat için ayrı bir K_M değeri vardır.

Tablo 5.3. Bazı enzimlerin K_M değerleri.

Enzim	Substrat	K_M
Kimotripsin	Asetil-L-triptofanamid	$5x10^{-3}$ M
Lizozim	Hekza-N-asetilglukozamin	$6x10^{-6}$ M
β-Galaktozidaz	Laktoz	$4x10^{-3}$ M
Treonin deaminaz	Treonin	$5x10^{-3}$ M
Karbonik anhidraz	CO_2	$8x10^{-3}$ M
Penisilinaz	Benzilpenisilin	$5x10^{-5}$ M
Piruvat karboksilaz	Piruvat	$4x10^{-4}$ M
	HCO_3^-	$1x10^{-3}$ M
	ATP	$6x10^{-5}$ M
Arginin-tRNA sentetaz	Arginin	$3x10^{-6}$ M
	tRNA	$4x10^{-7}$ M
	ATP	$3x10^{-4}$ M

K_M değerinin iki manası vardır. Birincisi K_M, enzimin aktif bölgelerinin yarısının dolduğu substrat konsantrasyonudur. İkincisi, K_M değerinin

$$E + S \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{k_3} P + E$$

denklemiyle gösterilen katalizleme mekanizması basamaklarının hız sabitleriyle münasebeti vardır. Yukarıda $K_M = k_2+k_3/k_1$ eşitliğini göstermiştik. Şimdi k_2'nin k_3'ten çok büyük olduğu bir durumu ele alalım. Bu ES'nin E ve S vermek üzere ayrılmasının, ürünün oluşmasından daha hızlı olduğu bir haldir. Bu durumda ($k_2 \gg k_3$ iken)

$$K_M = \frac{k_2}{k_1} \quad \text{olur.}$$

$$ES \underset{k_1}{\overset{k_2}{\rightleftharpoons}} E + S$$

denklemine göre ES'nin ayrışma sabiti,

$$K_{ES} = \frac{[E]\,[S]}{[ES]} = \frac{k_2}{k_1}$$

şeklinde ifade edilir. Yani $k_2 \gg k_3$ olduğu zaman, K_M ES'nin ayrışma sabitine eşittir. Bu durumda K_M, ES kompleksinin bir sağlamlık ölçüsüdür. Yüksek K_M zayıf bağlanmayı, düşük bir K_M kuvvetli bağlanmayı ifade eder. Sonuç olarak K_M, $k_2 \gg k_3$ iken, enzimin substrata olan ilgisinin derecesini gösterir.

Enzimlerin V_{max} değerleri de birbirlerinden çok farklıdır (Tablo 5.4). Aynı zamanda substratın yapısı, pH, sıcaklık ve iyonik şiddetle de değişirler. V_{max} enzimin katalitik aktivitesinin bir ifadesidir. Çünkü,

$$V_{max} = k_3 [E_T]$$

ile verilen maksimum hıza belirli konsantrasyondaki enzimin substratıyla doygunluk durumunda erişilir. Doygunluğun çok üzerindeki substrat konsantrasyonlarında hız, enzim miktarıyla doğru orantılıdır. Yani, enzim miktarını iki misline çıkardığımız zaman hız da iki misline çıkar.

V_{max} teriminin birimini "ürüne çevrilen substratın mol sayısı/ birim zaman" ve E_T'nin birimini de "mol enzim" alırsak (substrat ve enzim aynı çözelti hacmi içinde olduğundan konsantrasyonlardaki hacim birimleri birbirini götürür), k_3 hız sabitinin birimi de "ürüne çevrilen substrat mol sayısı / mol enzimxbirim zaman" olacaktır. Buradan "birim zamanda bir mol enzim tarafından ürüne dönüştürülen substratın mol sayısı" olarak tarif edilen "turnover sayısı"nın k_3 hız sabitine eşit olduğunu buluruz. Karbonik anhidraz, enzimler arasında en yüksek turnover sayısına sahip olanıdır (600.000 sn^{-1}). Yani bir karbonik anhidraz molekülü tarafından

$$CO_2 + H_2O \longrightarrow H_2CO_3$$

reaksiyonu 1/600.000 saniyede, yani 1,7 mikrosaniyede gerçekleştirilmektedir. Tablo 5.5'de enzimlerin turnover sayısı verilmektedir.

Tablo 5.4. D-Amino asit oksidaz enziminde substrat yapılarının V_{max} değerine etkisi (değerler D-alanin =100'e göre verilmiştir).

Substrat	Nisbi V_{max}
D-Tirozin	297
D-Prolin	231
D-Metiyonin	125
D-Alanin	100
D-Valin	55
D-Histidin	9,7
Glisin	0,0

5.3.e. V_{max} ve K_M Değerlerinin Grafikle Tayini

Bir enzimin kinetik özellikleri hakkında en faydalı bilgiler, Michaelis-Menten eşitliğinde yer alan enzimin substrata ilgisini ifade eden K_M sabiti ve enzimin katalitik aktivitesini gösteren V_{max} değerlerinden elde edilir. Bu iki değer deneysel olarak bulunur. Değişik substrat konsantrasyonlarında hızlar tayin edilir. Bulu-

nan değerler ya 12 denklemindeki yerlerine konularak veya Şekil 5.2'deki eğri çizilerek K_M ve V_{max} belirlenir. Fakat deneylerden elde edilen "v" yanlış olabilir. Bu Şekil 5.2'deki eğri üzerinde pek farkedilemez. Dolayısıyla bu eğriden ekstrapolasyonla sağlıklı V_{max} ve K_M değerleri elde edilemez. Aynı zamanda her enzimin doygun olduğu substrat konsantrasyonu hazırlanamayabilir. Bu yüzden Şekil 5.2'-deki eğrinin her noktası deneysel yoldan bulunamaz. Tabii ki bunun sonucu olarak da V_{max} ve K_M tesbit edilemez.

Tablo 5.5. Bazı enzimlerin maksimum turnover sayıları.

Enzim	Turnover sayısı (sn^{-1})
Karbonik anhidraz	600.000
3-Ketosteroid izomeraz	280.000
Asetilkolin esteraz	25.000
Penisilinaz	2.000
Laktat dehidrogenaz	1.000
Kimotripsin	100
DNA polimeraz I	15
Triptofan sentetaz	2
Lizozim	0,5

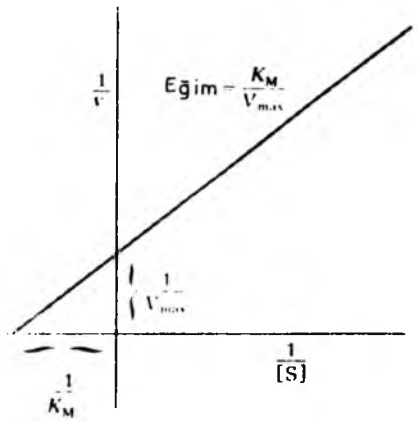
Yukarıda saydığımız sebeplerden dolayı Michaelis-Menten eşitliğini bir doğru denklemine dönüştürmek lazımdır. Bunu, eşitliğin her iki tarafını bire bölerek gerçekleştirebiliriz.

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M + [S]}{V_{max}[S]} \quad \text{eşitliğinden}$$

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{V_{max}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

ifadesi çıkartılabilir. Bu y=mx+n doğru denklemine benzemektedir. Doğrunun çizildiği grafikte $x=1/[S]$, $y=1/v$, eğim $m= K_M / V_{max}$ ve y ekseninin kesildiği nokta $1/V_{max}$

olur. Yukardaki ifadenin çizimi Şekil 5.3'te gösterilmektedir. Bu eğriye "Lineweaver-Burk eğrisi" adı verilir.



Şekil 5.3. Lineweaver-Burk eğrisi.

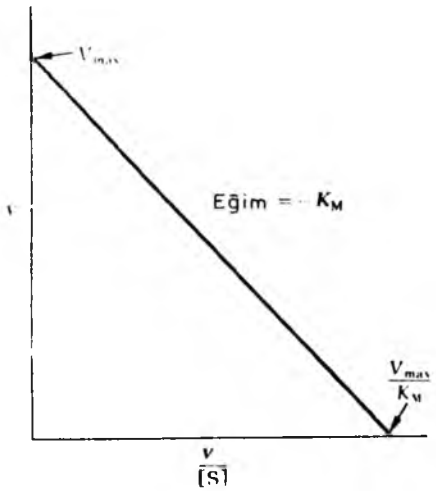
Eğri x-eksenini kesecek şekilde uzatıldığında kesme noktası $-1/K_M$'yi verir. Görüldüğü gibi bu eğriden faydalanarak V_{max} ve K_M değerleri bulunabilir. Deneylerde ortaya çıkan yanlış sonuçlar da, doğru üzerinde büyük sapmalar halinde, kolayca farkedilebilir.

Her ne kadar bu çizim şekli pek sık kullanılırsa da, pek hassas değildir. Çünkü eğri üzerinde düşük substrat konsantrasyonları ve onlara karşılık gelen hız değerleri daha çok yer almaktadır. Genellikle düşük substrat konsantrasyonlarında elde edilen sonuçlar daha az sağlıklıdır. Bu aksaklıkları ortadan kaldırmak için Lineweaver-Burk denkleminin her iki tarafının V_{max} x v ile çarpılması ve gerekli düzenlemelerin yapılmasıyla

$$v = -K_M \times \frac{v}{[S]} + V_{max}$$

doğru denklemi elde edilmiştir. v, v/[S]'na karşı çizildiği zaman Şekil 5.4'deki eğri bulunur. Bu eğriye Eadie-Hofstee eğrisi adı verilir. Şekilden görüldüğü gibi bu çizimden K_M ve V_{max} kolayca bulunabilmektedir. Aynı zaman-

da Lineweaver-Burk eğrisinde güç farkedilebilen lineerlikten sapmalar burada rahatlıkla gözlenebilmektedir.



Şekil 5.4. Eadie-Hofstee eğrisi.

5.3.f. Enzimli Reaksiyon Hızlarının Kofaktörlere Bağımlılığı

Michaelis-Menten eşitliği, substrat konsantrasyonu ile enzimli reaksiyon hızı arasındaki münasebeti tanımlamanın yanısıra, hızla kofaktör konsantrasyonu arasındaki ilişkileri de açıklar. Şimdi

E+koenzim $\rightleftharpoons$ E-koenzim
(inaktif) (aktif)

dengesini ele alalım. Enzimin aktif hali daha sonra

E-koenzim + S $\rightleftharpoons$ S-E-koenzim

denge reaksiyonu ile substrata bağlanarak enzim-substrat-koenzim kompleksini oluşturur. Reaksiyon hızı bu kompleksin konsantrasyonu tarafından tayin edilir. Bu olayda enzimin yalnız substratla değil, kofaktörüyle de doyması söz konusudur.

K_M Michaelis sabitinin yarı maksimum hızdaki substrat konsantrasyonu ve enzimin substrata ilgi derecesinin ifadesi olduğunu biliyoruz. Aynı şekilde enzimin kofaktö-

rüne ilgisini gösteren ve yarı maksimum aktivitenin gerçekleştiği kofaktör konsantrasyonuna eşit olan bir Michaelis sabiti de kofaktör için vardır. Kofaktör K_M değeri, doygunluk seviyesindeki sabit substrat konsantrasyonunda, kofaktör konsantrasyonunun reaksiyon hızı üzerine etkisinin ölçülmesiyle elde edilir. Özet olarak koenzimli reaksiyonların kinetiği incelenirken koenzimler substrat gibi muameleye tabi tutulurlar.

5.4. ENZİM KATALİZİNİN MEKANİZMASI

Enzimler, kimyasal dengenin yerleşmesini hızlandırırlar. Bu hızlandırma, kimyasal katalizörlerin çok fevkindedir. Buna örnek olarak üreaz enziminin kataliz gücünü verelim:

Üreaz enzimi, üreyi aşağıdaki reaksiyona göre hidroliz ederek NH_4^+ ve HCO_3^- iyonlarına dönüştürmektedir:

$$NH_2CONH_2 + 2H_2O + H^+ \longrightarrow 2NH_4^+ + HCO_3^-$$

pH 8,0 , 20°C ve su içinde bu reaksiyonun hız sabiti, enzim yokluğunda $3x10^{-10}$ sn^{-1} iken, enzim varlığında $3x10^4$ sn^{-1} 'dir. Böylece üreaz enzimi bu reaksiyonu 10^{14} kat hızlandırır. Benzer hesaplamalar diğer enzimatik reaksiyonlar için de yapıldığında, enzimlerin reaksiyonları 10^6 - 10^{20} kat arasında hızlandırdığı gözlenir. Enzimlerin bu fevkalâde kataliz gücünde başlıca dört önemli faktör rol oynar:

1.Enzim, substrat molekülünü bağlıyarak, parçalanacak bağın aktif merkezdeki katalitik gruba çok yakın durmasını ve ara ürünün kolayca oluşmasını sağlar.

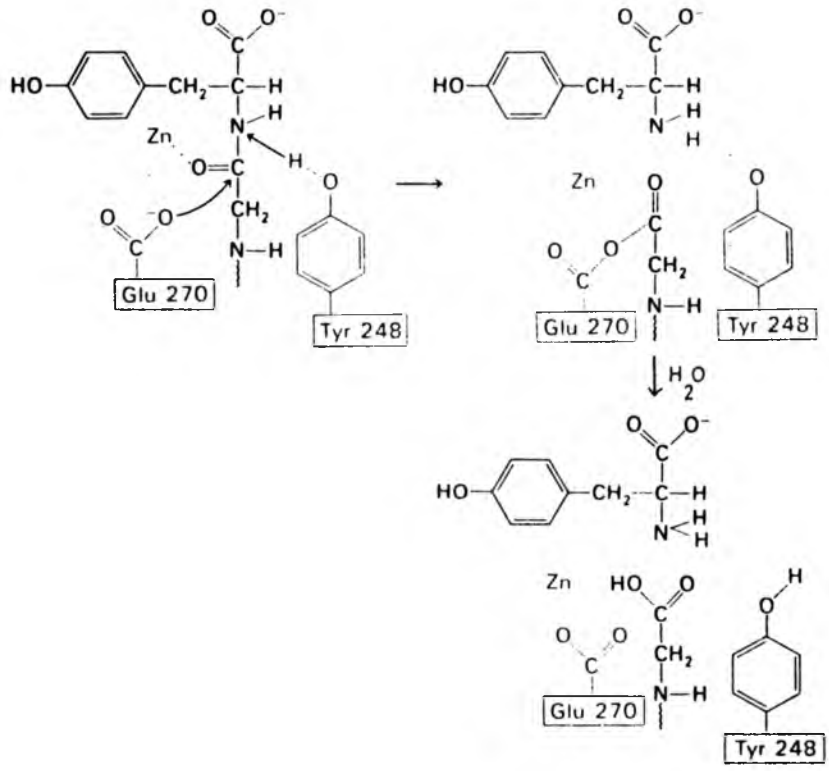
2. Bazı enzimler, substratla dayanıksız kovalent ara ürünler oluştururlar; böylece reaksiyonun kolaylaşmasını sağlarlar.

3.Proton verici veya proton alıcı olarak fonksiyon

gören bazı fonksiyonel gruplar vasıtasıyla bir enzim, genel bir asit veya baz katalizini gerçekleştirebilir.

4.Enzim, substrat molekülündeki parçalanacak olan bağın gerilmesi veya deformasyonunu sağlayarak, bağın parçalanmasını kolaylaştırır.

Şekil 5.5, enzim katalizinin mekanizmasına örnek olarak karboksipeptidaz A enziminin mümkün olan bir etki mekanizmasını göstermektedir. Önce enzimin 270. pozisyonunda yer alan glutamik asit, peptid bağının karbonil karbon atomuna direkt olarak hücum eder. Bu sırada 248. pozisyonda yer alan tirozin, bu peptidin NH-grubuna bir proton verir. Daha sonra oluşan anhidrit bağı hidroliz olur.



Şekil 5.5. Karboksipeptidaz A enziminin kataliz mekanizması.

5.5. ENZİM AKTİVİTESİ VE MİKTARININ TAYİNİ

Bir çözelti veya doku ekstraktı içindeki enzim miktarı, enzimin katalitik aktivitesinden faydalanarak bulunur. Bu iş için enzim hakkında şu bilgiler gerekmektedir: (1) Katalizlenen reaksiyon denklemin net stokiyometrisi, (2) Enzimin kofaktör veya metal iyonuna ihtiyacı olup olmadığı, (3) Substrat ve varsa kofaktörü için K_M değerleri, (4) Optimum pH'sı, (5) Enzimin kararlı ve aktivitesinin yüksek olduğu sıcaklık aralığı ve (6) Substratın kayboluş veya ürünün teşekkül hızlarının tesbit edilebildiği basit bir analitik metod.

Enzimler, optimum pH'da ve doygunluğun üzerindeki substrat konsantrasyonlarında çalışırlar. Böylece sıfırıncı mertebeden bir reaksiyon oluşur. Kofaktörlü enzimlerle ilgili tayinlerde, koenzim veya metal iyonları konsantrasyonları doygunluğun çok üzerinde alınır. Bu durumda sistemde hızı sınırlayan tek faktör enzim konsantrasyonudur. Yani hız, enzim miktarıyla doğru orantılıdır ve çözeltideki enzim seviyesini direkt olarak verir. Ürünün teşekkül hızının ölçülmesi genellikle substratın harcanma hızına göre daha hassas sonuçlar verir. Çünkü tayinlerdeki substrat konsantrasyonu oldukça yüksektir ve harcanan miktar da buna oranla çok düşüktür. Dolayısıyla farkı hassas olarak belirlemek imkânsızdır. Reaksiyon ürünleri özel kimyasal veya spektroskopik metodlarla ölçülür. İkincisi daha avantajlıdır, çünkü reaksiyonun devamı boyunca ölçüm yapabilmek ve buna paralel olarak sonuçları grafik üzerine kaydetmek mümkündür.

Bir çözelti içindeki enzim aktivitesi "enzim ünitesi" (birimi) cinsinden verilir. Her enzimi kapsayacak bir ünite tarifi olmamasına rağmen, 25 °C'da ve optimal şartlarda 1 mikromol (10^{-6} mol) substratı bir dakikada ürüne dönüştüren enzim miktarına "1 enzim ünitesi" denilmesi genelde kabul edilmiştir. Ancak uluslararası ölçü sistemine göre zaman birimi saniye, madde miktarı birimi

mol olduğundan bu sistemde enzim aktivite birimi kataldır. 1 katal enzim, belirli şartlar altında saniyede bir mol madde dönüşümüne sebep olur. Bazı enzimler için özel ünite tanımları da vardır. "Spesifik aktivite" (özgül aktivite) terimi de 1 mg protein başına enzim ünitesi (E.Ü./mg protein) olarak tarif edilir. Bu enzim saflığının bir ölçüsüdür ve enzim izolasyonu esnasındaki basamaklarda maksimum ve sabit bir değere ulaşır. Böylece enzimin saf halde elde edildiği anlaşılır. Enzimlerin izolasyonu ve saflaştırılmasında, proteinlerde uygulanan metodlar aynen geçerlidir.

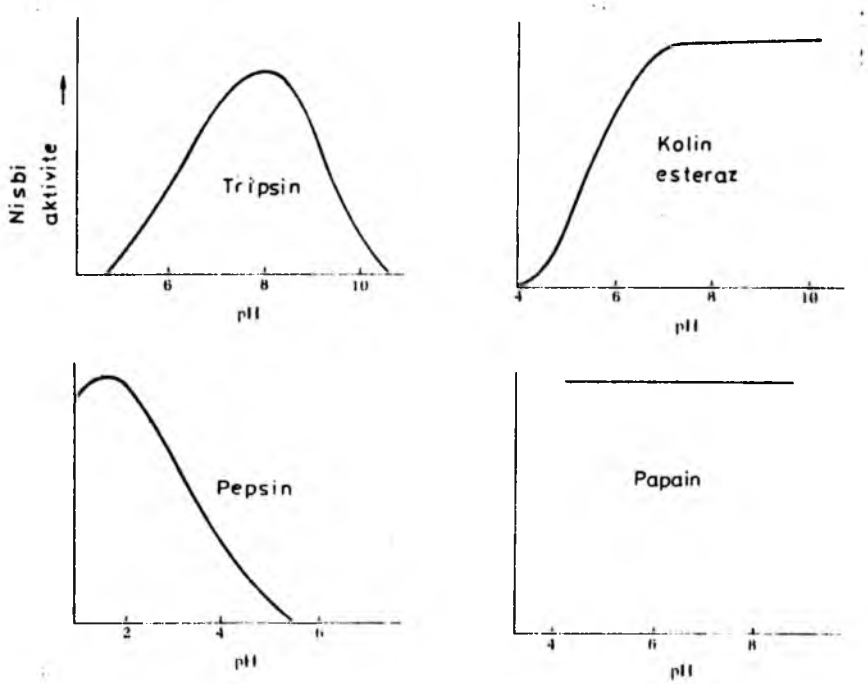
5.6. ENZİM AKTİVİTESİ ÜZERİNE pH'NIN ETKİSİ

Her enzim için aktivitelerinin maksimum olduğu pH değerleri vardır (Tablo 5.6). Bu değerlerin üzerinde ve altında aktivite düşer. Bununla beraber bütün enzimlerin pH-aktivite eğrileri aynı şekilde değildir. Şekil 5.6'da bazı enzimler için bu eğriler verilmiştir. Bu çizimleri incelemeden önce bir enzimin pH-aktivite münasebetinde etkili olan faktörleri ele alalım. Bu faktörler şunlardır: (1) Substratı bağlamada görev alan ve enzim aktif bölgesinde bulunan iyonlaşabilir grupların pK'sı, (2) Enzime bağlanma olayında görev gören substrat gruplarının pK'sı, (3) Enzim üzerindeki katalitik göreve sahip grupların pK'sı, (4) Enzimin biyolojik olarak aktif konformasyonunu belirleyen grupların pK'sı. pH-aktivite eğrileri, herbir pH için substratla doyurulmuş enzim çözeltileri ile yapılan deneyler sonucu elde edilir. Çünkü birçok enzimin K_M sabiti pH ile değişir.

Elektriksel yönden nötür veya üzerindeki yüklerin kataliz olayında hiçbir rolü olmadığı substratlara sahip enzimlerin, pH-aktivite eğrileri çok basittir. Meselâ Şekil 5.5'teki papain buna bir örnektir. Aynı şekilde nötral bir molekül olan sukrozu hidrolizleyen invertaz enziminin aktivitesi pH 3,0-7,5 arasında sabittir.

Tablo 5.6. Bazı enzimlerin optimal pH'sı.

Enzim ve substrat	Optimal pH
Pepsin	
Yumurta albümini	1,5
Hemoglobin	2,2
Piruvat karboksilaz	
Piruvat	4,8
Katalaz	
H_2O_2	7,6
Tripsin	
Benzoilargininamid	7,7
Benzoilarginin etil ester	7,0
Alkalen fosfataz	
Gliserol-3-fosfat	9,5
Arginaz	
Arginin	9,7



Şekil 5.6. Bazı enzimlerin pH-aktivite çizimleri.

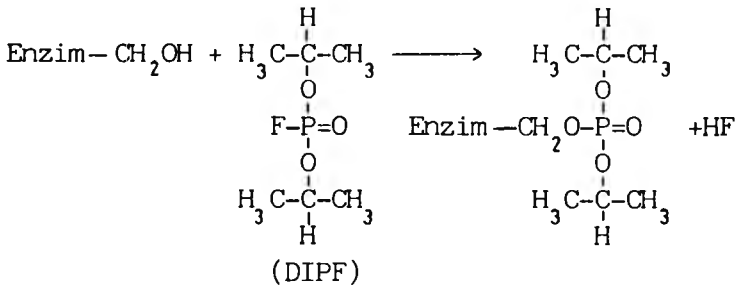
Bir enzimin optimum pH'sı normal hücre içi ortamı pH'sı ile aynı değildir. Şekil 5.5'teki eğrilerin bazen artan, bazen de azalan bölümünde yer alır. Bu durum hücre içindeki enzim aktivitesinin kontrolünde, pH-aktivite ilişkisinin önemini göstermektedir. Hücrelerde herbirisinin pH'ya karşı davranışı farklı yüzlerce enzim mevcuttur ve pH'nın karmaşık hücre içi kontrol ağında çok mühim bir yeri vardır.

5.7. ENZİM İNHİBİSYONU

Enzimlerin hem in vivo hem de in vitro aktivitelerinin, bazı bileşikler tarafından azaltılması ve hatta yok edilmesi olayına "inhibisyon" adı verilir. Buna sebep olan bileşiklere de inhibitör denilir. İnhibitörler genellikle küçük molekül ağırlığına sahip bileşikler veya iyonlardır.

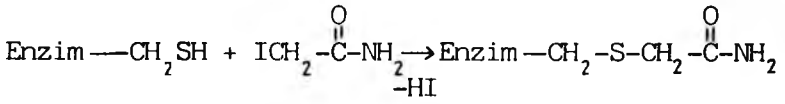
Enzimatik aktivitenin inhibisyonu, biyolojik sistemlerde başlı başına bir kontrol mekanizmasını oluşturduğundan, önemli bir olaydır. Birçok ilaçlar ve zehirli bileşikler de fonksiyonlarını bu yolla gerçekleştirirler. İnhibisyon olayından aynı zamanda enzim etki mekanizmalarının incelenmesinde de faydalanılır.

Enzimatik inhibisyon dönüşümlü veya dönüşümsüz olabilir. Dönüşümsüz inhibisyon da inhibitör enzime ya kovalent olarak bağlanır veya zor ayrışabilen bir kompleks oluşturur. Sinir uyarılarının nakledilmesinde önemli bir rol oynayan asetil kolin esteraz enziminin sinir gazı zehirleri tarafından inhibisyonu buna bir örnektir. Bu gazlardan diizopropilfosfofloridat (DIPF), enzimin aktif bölgesinde yer alan serin amino asidi ile reaksiyona girerek, inaktif diizopropilfosfo-enzimi oluşturur. Aşağıdaki reaksiyon aktif bölgesinde serin ihtiva eden kimotripsin ve asetil kolin esteraz enzimlerinin DIPF ile etkileşmesini göstermektedir.



(DIPF)

İyodasetamid gibi alkilleyici bileşikler de, bazı enzimleri dönüşümsüz olarak inhibe ederler. Etkilerini sistein ve diğer yan zincirleri modifiye ederek gösterirler.



İyodasetamid

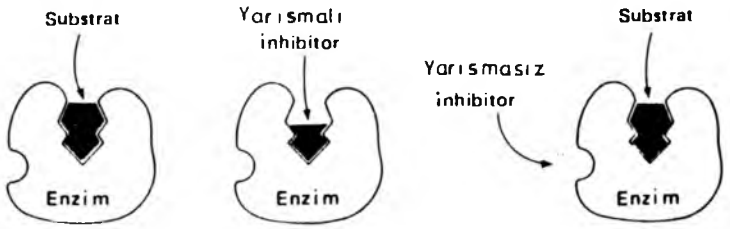
Dönüşümsüz inhibisyonun aksine dönüşümlü inhibisyonda, enzimle inhibitör etkileşmesi bir denge reaksiyonu şeklindedir. Dönüşümlü inhibisyonun en basit tipi yarışmalı (kompetitif) olanıdır. Yarışmalı inhibitör, yapı itibarıyla substrata benzer ve enzimin aktif bölgesine bağlanır (Şekil 5.7). Böylece substratın enzime bağlanması önlenmiş olur. Fakat substrat konsantrasyonunu artırmakla inhibisyon etkisi bertaraf edilebilir. Yani enzimin V_{max} değeri değişmez. Çünkü hem enzim-substrat, hem de enzim-inhibitör komplekslerinin ayrışmaları bir denge reaksiyonu olduğundan substrat konsantrasyonunun artırılması dengeyi ES kompleksi lehine kaydırır.

ES $\rightleftharpoons$ E + S dengesine benzer şekilde, I inhibitörü gösterdiğinde

EI $\rightleftharpoons$ E + I denge denklemini yazabiliriz. Son reaksiyonun denge sabiti K_i,

$$K_i = \frac{[E]\,[I]}{[EI]}$$

şeklinde ifade edilir.



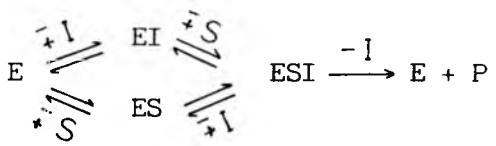
Şekil 5.7. Yarışmalı ve yarışmasız inhibisyonların şematik gösterilişi: **(a)** Enzim-substrat kompleksi, **(b)** Yarışmalı bir inhibitörün substratın yerine bağlanması ve **(c)** Yarışmasız bir inhibitörün substrattan farklı bir bölgeye bağlanması.

Yarışmalı inhibitör kataliz hızını, ES kompleksi oranını düşürerek azaltır. Bir başka ifade ile enzimin K_M değeri artar. Bu tip inhibisyona, malonatın süksinat dehidrogenaz enzimi üzerindeki etkisi klasik bir örnek olarak verilmektedir. Bu enzim süksinattan iki hidrojen atomunun çıkarılmasını katalizler.

Süksinat Malonat

Yukarıda görüldüğü gibi malonat, süksinata nazaran bir eksik metilen grubu ihtiva ettiğinden, iki karboksil grubu vasıtasıyla enzime yapışır, fakat hidrojen verebilecek iki karbon atomu olmadığından değişmeden kalır.

Yine dönüşümlü bir tip olan yarışmasız inhibisyonda inhibitör ve substrat enzim molekülüne aynı anda bağlanabilirler (Şekil 5.7). Bu, bağlanmanın enzimin aynı bölgesine olmadığını gösterir. Yarışmasız bir inhibitör etkisini bir enzimin turnover sayısını, yani katalitik aktivitesini düşürerek icra eder. Burada substrat ve inhibitör arasında yarışma söz konusu değildir. Substrat konsantrasyonunu artırmakla inhibisyon kaldırılamaz. Enzimin V_{max} değeri azalırken, K_M sabit kalır. Substrat ve inhibitör farklı bölgelere yapışabildiğinden enzimin iki çeşit inaktif kompleksi husule gelir: EI ve ESI.ESI'-dan I dönüşümlü olarak ayrışabildiğinden yine ürün meydana gelebilir, fakat katalizlemede yavaşlama olur. Bu tip inhibisyonda aşağıdaki reaksiyonlar olabilir:



Yarışmasız inhibisyona örnek olarak, enzimlerin aktivitelerinde gerekli olan sisteinlerin -SH gruplarına bazı ağır metal iyonlarının merkaptan oluşturacak şekilde dönüşümlü olarak bağlanmalarını verebiliriz. Burada vuku bulan denge reaksiyonunu Ag^+ iyonu için şöyle gösterebiliriz.

$$E\text{-}SH + Ag^+ \rightleftharpoons E\text{-}S\text{-}Ag + H^+$$

Burada -SH grubu aktif bölgede bulunabildiği gibi, enzim konformasyonunu teşkil eden kritik bir kısımda da olabilir. Katalizlemede metal iyonlarına ihtiyacı olan enzimlerin aktiviteleri, bazı bileşiklerin metal iyonlarına dönüşümlü bağlanması sonucu yarışmasız olarak inhibe edilebilirler. Meselâ siyanür Fe^{+2} ve Fe^{+3} ihtiva eden enzimleri, etilendiamintetraasetat (EDTA) da Mg^{+2} 'li enzimleri bu iyonlara bağlanarak inhibe ederler.

İnhibitörleri çok defa yarışmalı ve yarışmasız olmak üzere kesin sınırlarla birbirinden ayırmak mümkün değildir. Gerçekte inhibisyon umumiyetle karışıktır. Yani

kısmen yarışmalı, kısmen de yarışmasızdır.

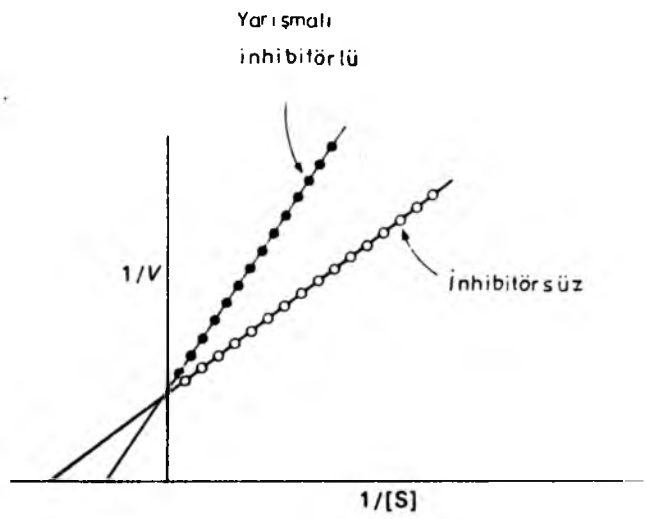
Birden fazla polipeptid zincirinden meydana gelen allosterik enzim adı verilen enzimlerde, allosterik inhibisyon adı verilen bir başka çeşit inhibisyon olayı gözlenir. Bu inhibisyon çeşidinde, inhibitörler enzimin aktif merkezinden başka yere bağlanırlar ve üç boyutlu yapıyı değiştirerek enzim aktivitesini etkilerler.

5.8. İNHİBİSYONLARIN GRAFİK ÜZERİNDE İNCELENMESİ

Farklı substrat ve inhibitör konsantrasyonlarında yapılan enzimli reaksiyon hızları ölçümleri yarışmalı ve yarışmasız inhibisyonların ayırdedilmelerini sağlar. Bulunan değerlerin Lineweaver-Burk eğrilerinin çizilmesi sonucunda; yarışmalı inhibisyonda doğrunun eğiminin değişirken, 1/v eksenini kestiği nokta aynı kalır (Şekil 5.8) İnhibitör konsantrasyonu artırıldıkça eğim de artar. V_{max} yarışmalı inhibisyonda değişmez. Bu da yüksek substrat konsantrasyonlarında inhibisyonun kalktığını gösterir. Çünkü substrat ve inhibitör aynı bölge için yarışmaktadır ve [S] yüksek olduğu zaman aktif bölgelerin tamamı substrat tarafından doldurularak, enzim tam kapasite ile çalışır. Doğru eğiminin inhibisyondaki artışı, yarışmalı inhibitörün bağlanma kuvvetini gösterir. Lineweaver-Burk denklemi yarışmalı inhibisyonda şu şekli alır:

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_M}{V_{max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) \frac{1}{[S]}$$

Burada [I], inhibitör konsantrasyonu, K_i de enzim-inhibitör kompleksinin (EI) ayrışma sabitidir. Diğer bir deyimle yarışmalı inhibitörün mevcudiyetinde doğrunun eğimi $(1+[I] / K_i)$ çarpanı kadar artar. K_M'si 10^{-4} M olan bir enzim düşünelim. İnhibitör yok iken $v=V_{max}/2$ değerine $[S]=10^{-4}$M konsantrasyonunda ulaşılırken, 2×10^{-3}M'lık I konsantrasyonunda ve $K_i = 10^{-3}$ M'da görünen K_M, 3×10^{-4} M olacaktır. Bunun sonucu olarak da $v = V_{max} / 4$ kadar bir değere inecektir.



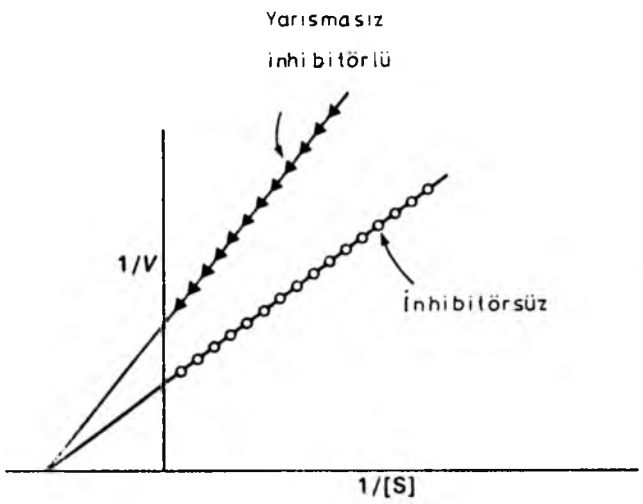
Şekil 5.8. Yarışmalı bir inhibitörün mevcudiyetinde ve yokluğunda enzimatik reaksiyon hızının Lineweaver-Burk eğrisi; V_{max} aynı kalırken K_M artar.

Yarışmasız inhibisyonda (Şekil 5.9) Lineweaver-Burk eğrisinin y-eksenini kestiği nokta artar, yani V_{max} azalır. K_M / V^I_{max} değerine eşit olan eğim de aynı oranda artar. V_{max} 'un aksine K_M yarışmasız inhibitörden etkilenmez. Bu çeşit inhibisyon, substrat konsantrasyonunu artırmakla yok edilemez. Yarışmasız inhibitör mevcudiyetindeki maksimum hız (V^I_{max}) aşağıdaki ifade ile verilir:

$$V^I_{max} = \frac{V_{max}}{1+[I]/K_i}$$

5.9. ENZİMLERİN SPESİFİKLİĞİ (ÖZGÜLLÜĞÜ)

Enzimler, hem katalizledikleri reaksiyon tiplerine, hem de ürüne dönüştürdükleri substratlara karşı son derece spesifiktirler. Genellikle tek bir kimyasal reaksiyonu



Şekil 5.9. Yarışmasız bir inhibitörün mevcudiyetinde ve yokluğunda enzimatik reaksiyon hızının Lineweaver-Burk eğrisi; V_{max} azalırken K_M aynı kalır.

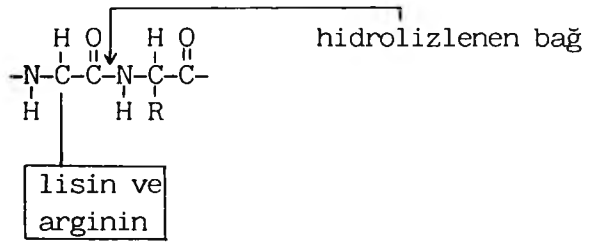
veya aynı tip benzer reaksiyonları katalizlerler. Substratlara karşı spesifiklikleri ise oldukça yüksek, hatta bazen mutlaktır.

Meselâ proteolitik enzimleri ele alalım. Bunlar peptid bağlarının aşağıdaki gibi hidrolizini katalizlerler:

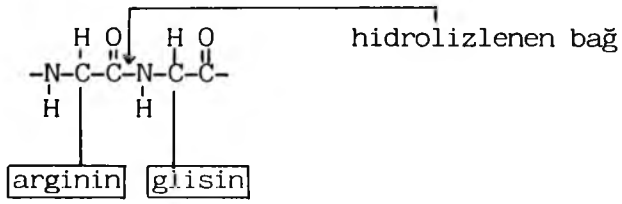
peptid — karboksil bileşen — amino bileşen

Proteolitik enzimlerin substrat spesifiklikleri birbirle-

rinden farklıdır. Bazı bakterilerden elde edilen subtilisin enzimi, koparılacak peptid bağını, komşu yan grupların cinsini ayırdetmeksizin hidrolizler. Tripsin ise, yalnız lisin ve arginin rezidülerinin karboksil tarafındaki peptid bağlarını parçalar.



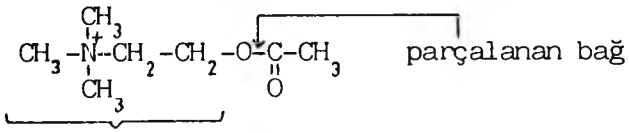
Kan pıhtılaşmasında görev alan trombinin substrat spesifikliği, tripsine göre daha çoktur. Bu enzimin parçaladığı peptid bağının karboksil bileşeni arginine, amino bileşeni de glisine ait olmalıdır.



Birçok enzim stereospesifiklik özelliği de taşırlar. Meselâ laktat dehidrogenaz yalnız L-laktat, glutamat dehidrogenaz yalnız L-glutamat ve D-amino asit oksidaz enzimi de D-amino asitleri üzerinde etkilidir. Bazı enzimler de daha geniş bir spesifiklik gösterirler ve benzer yapısal özelliklere sahip birçok bileşiğin dönüşümünü katalizleyebilirler. Meselâ fosfatazlar birçok farklı fosforik asit esterlerini hidrolizlerler.

Bir enzimin substratına spesifikliğinin ortaya çıkması için iki ayrı yapısal özelliğin lâzım olduğu çalışmalar sonucu belirlenmiştir. Birincisi, substrat enzim tarafından etkilenebilecek bir kimyasal bağa sahip olmalıdır. İkincisi, substrat üzerinde enzimin yapışabileceği ve substratı katalitik bölgenin etkileyebileceği pozisyo-

na getirebilecek gruplar bulunmalıdır. Bu grupların parçalanacak bağla spesifik bir geometrik ilişkisi de vardır. Meselâ, asetil kolin esterazda hidrolizlenen bağ, kolin ile asetil grubu arasında yer almaktadır; pozitif yüklü kuaterner amonyum grubu da enzimin substrata yapışması için gereklidir. Bu enzimin yarışmalı inhibitörleri için de bu pozitif yüklü gruplar lâzımdır.



enzimin bağlanma ve pozisyona getirme grubu

5.10. ENZİMLERİN AKTİF BÖLGELERİ

Bir enzimin aktif bölgesi, substratları (varsa kofaktörleri) bağlayan ve bağ yapım ile yıkımında görev yapan rezidüleri kapsar. Bunlara katalitik grup adı da verilir. Enzimlerin yapı, spesifiklik ve kataliz özellikleri farklı farklı olmasına rağmen, aktif bölgelerinin aşağıdaki ortak özelliklerini sayabiliriz:

1.Aktif bölge, enzimin toplam hacmına oranla küçük bir kısmını oluşturur. Enzimdeki amino asitlerin birçoğu substratla temas halinde değildir. Bu enzim moleküllerinin niçin büyük olduğu sorusunu ortaya çıkarır.

2.Aktif bölge üç boyutlu bir birimdir. Bu bölge bir nokta, bir çizgi ve hatta bir yüzey değildir. Enzimin lineer yapısının değişik noktalarında bulunan grupların biraraya gelerek oluşturdukları üç boyutlu karmaşık bir yapıdır. Birbirlerinden çok uzakta bulunan amino asitler bile kıvrılmalar sonucu katalitik grupta görev alabilirler. Meselâ lizozim enziminin aktif bölgesi, 129 amino asitlik lineer sıralamalarda 35, 52,62,63, ve 101

nolu rezidülerden müteşekkildir.

3.Substratlar enzimlere nisbeten zayıf kuvvetle bağlanır. ES komplekslerinin denge sabitleri 10^{-2} -10^{-8} M arasında değişir. Bu da -3 ile -12 kcal/mol arasında değişen bağ enerjilerine karşılık gelir. Halbuki kovalent bağların kuvveti -50 ile -110 kcal/mol arasındadır.

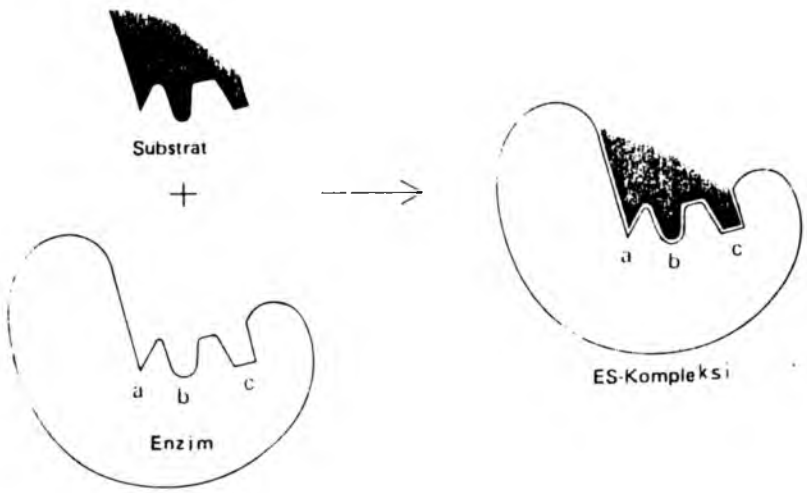
4.Aktif bölgeler bir yarık ve girinti içinde yer alırlar. Yapısı incelenmiş olan bütün enzimlerde substrat molekülleri suyun girmediği çukur bölgelere bağlanırlar. Girinti içinde bağlanma ve kataliz içinde gerekli polar gruplar da vardır. Girintinin apolar karekteri substratın bağlanma gücünü de artırır. Bunun yanısıra girintiler, katalizde esas olan bazı özellikleri polar yan gruplara kazandıracak bir mikro çevre de oluştururlar.

5.Spesifik bir bağlanma, atomların aktif bölgede belirli tarzda düzenlenmeleri sonucu mümkün olur. Substrat bu bölgeye tam oturabilecek şekle sahip olmalıdır (Şekil 5. 10.a). Enzimle substrat arasındaki bu anahtar-kilit modeli kataliz olayının stereospesifikliğini çok iyi açıklamaktadır. Bununla beraber, son zamanlarda yapılan çalışmalar bazı enzimlerin aktif bölgelerinin rijid bir yapıda olmadığını göstermiştir. Bu tip enzimlerde aktif bölgenin şekli substratın bağlanmasıyla değişikliğe uğramaktadır. Bölge yalnız bağlanmadan sonra substrata komplamenter hale gelmektedir. Bu ikinci çeşit bağlanma modeline etkileşme sonucu uygunluk modeli (induced fit) adı verilir (Şekil 5.10.b).

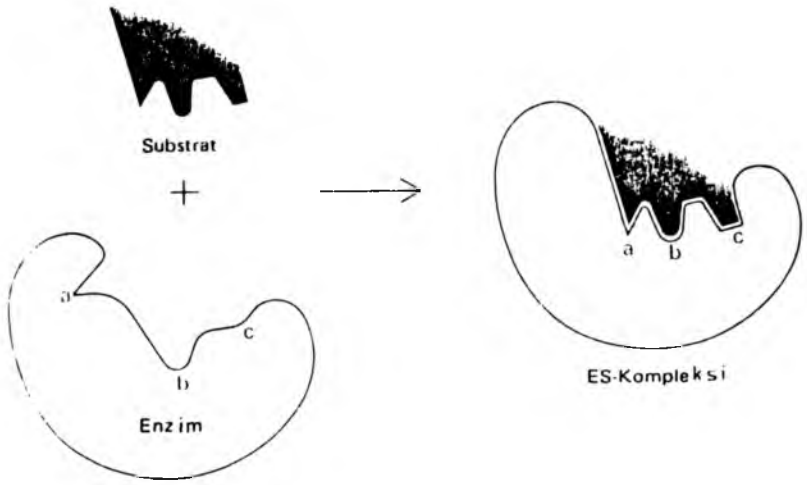
5.11. MULTİENZİM SİSTEMLERİ

Sağlam bir hücrede enzimler birarada çalışırlar ve seri halde birçok reaksiyonu katalizlerler. Birinci enzimin ürünü daha sonrakinin substratı olur. İşte bu tip enzimlerin oluşturdukları enzim topluluklarına multienzim

sistemleri adı verilir ve üç tip moleküler organizasyona sahiptirler:



(a)



(b)

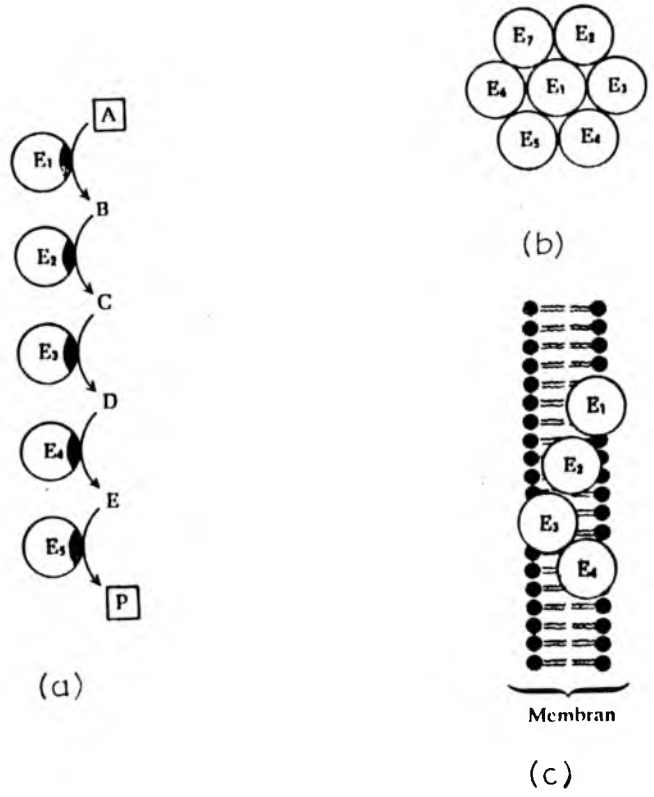
Şekil 5.10. Substrat-enzim etkileşmeleri; **(a)** anahtar-kilit modeli:enzimin aktif bölgesi substrata kendiliğinden komplamenterdir, **(b)** etkileşme sonucu uygunluk modeli: enzim substratın bağlanmasıyla şekil değiştirir ve substrata komplamenter hale gelir.

En basit tipteki multienzim sistemlerinde enzimler sitoplazma gibi bir sıvı içinde çözünmüş ve birbirlerinden ayrı halde bulunurlar. Küçük substrat molekülleri bir enzimden diğerine difüzyonla giderler. Örnek olarak glikoliz ve pentoz fosfat yolu enzimleri verilebilir (Şekil 5.11.a).

İkinci tip multienzim sistemlerinde enzimler, son derece organize olmuş ve birbirleriyle fiziksel manada birleşmiş, enzim kompleksleri halinde, fonksiyonlarını beraberce yerine getirirler (Şekil 5.11.b). Meselâ maya hücrelerinde yağ asitlerinin sentezini gerçekleştiren yağ asidi sentetaz enzim kompleksi, birbirlerine sıkıca bağlanmış yedi çeşit enzim molekülü ihtiva eder. 60'tan fazla polipeptid zinciri taşıyan enzim kompleksleri de vardır (piruvat dehidrogenez enzim kompleksi gibi). Kompleksten uzaklaşan enzim molekülleri aktivitelerini kaybederler. Substrat, kompleksten hiç ayrılmadan birçok kademeden sonra ürüne dönüşür. Bu şekildeki bir multienzim sistemi biyolojik yönden çok avantajlıdır; çünkü substrat difüzyon yolunda vakit geçirmeden daha kısa zamanda ürüne çevrilir.

Üçünce tip multienzim sistemlerinde enzimler, membranlar veya ribozomlar gibi yapılar üzerinde dizilmiş haldedir (Şekil 5.11.c). Örnek olarak solunum zinciri ve protein sentezi enzimleri verilebilir. Birincisinde enzimler mitokondri iç membranında sıralanırken, ikincisinde ribozomlar üzerine yapışmış durumdadır.

Bir multienzim sisteminin kinetiği tek bir enziminkinden daha karmaşıktır. Sistemin herbir enziminin substrat ve kofaktörü için ayrı ayrı K_M değerleri vardır. Reaksiyon hızları, reaksiyonu en yavaş yürüyen enziminki ile sınırlıdır. Bugün multienzim sistemlerinin kinetiğinin incelenmesinde bilgisayarların da yardımıyla büyük başarı sağlanmıştır.



Şekil 5.11. Multienzim sistemleri: **(a)** Çözünmüş ve birbirinden ayrı enzimleri olan sistemde, substrat ve ara bileşikler difüzyonla enzimleri bulur; **(b)** Enzim komplekslerinde substrat enzimlerden ayrılmadan ürüne dönüşür; **(c)** Membrana bağlı bir enzim sistemi.

5.12. ENZİMATİK REAKSİYONLARIN KONTROL VE DÜZENLENMESİ

Birçok multienzim sistemi, net reaksiyon hızlarını kendi kendilerine düzenleme kapasitesine sahiptir. Bu sistemlerin çoğunda, seri reaksiyonların son ürünü belirli bir konsantrasyona eriştiğinde sistemin ilk enzimini inhibe eder. Meselâ L-treoninin beş basamaklı bir reaksiyonla L-izolösine dönüştürülmesini katalizleyen enzimlerden birincisi, L-treonin deaminaz, son ürün olan L-izolö-

sin tarafından kuvvetli bir şekilde inhibisyona uğrar. Diğer ara bileşikler böyle bir özellik göstermezler. Burada izolösin son derece spesifik bir inhibitördür; çünkü diğer amino asitler ve benzer yapıdaki bileşikler L-treonin deaminaz enzimini inhibe etmezler. Bu tip son ürün inhibisyonuna feedback inihibisyonu adı verilir.

Kendi reaksiyonlarını düzenleyen enzim sistemlerinin çoğunda, son ürün tarafından inhibe edilen enzim, reaksiyon serisinin ilk enzimidir. Bu enzimlere düzenleyici veya allosterik enzim adı verilir. Allosterik enzimlerin aktivitelerini etkileyen bileşiklere modülatör denir. Eğer etki aktiviteyi artırıcı pozitif yönde ise aktivatör, aktiviteyi azaltıcı negatif yönde ise inhibitör adını alır. Allosterik enzimler, sistemin dallanma noktasındaki enzimler de olabilir. Sistem tarafından oluşturulan son ürünler ve hatta başlangıçta bunlara bağlı olarak sentezlenen bileşikler, bu enzimleri inhibe edebilirler. Yani allosterik enzimler birden fazla modülatör bileşik tarafından etkilenebilir. Bunlara multivalan (çok değerlikli) allosterik enzim denilir. Bu bileşiklerden bazılarının etkisi pozitif, bazılarının ki ise negatif yöndedir.

Allosterik enzimlerin en önemli ortak özelliği, katalizledikleri reaksiyonların hücre içi şartlarında dönüşümsüz olmasıdır. Yani ilk enzim reaksiyonunu katalizlediği zaman, diğerleri de hemen gerçekleşir.

Allosterik enzimler diğerlerine nazaran daha büyük, daha kompleks ve saflaştırılmaları daha zordur. Genellikle hepsi birden fazla polipeptid zinciri ihtiva eder. Kinetik özellikleri Michaelis-Menten ifade ve eğrisinden sapmalar gösterir.

Üç tip allosterik enzim tesbit edilmiştir: (1) Homotropik, (2)Heterotropik ve (3) Homotropik- heterotropik. Homotropik allosterik enzimlerde substrat, aynı zamanda konsantrasyonuna göre katalitik aktiviteyi artırıcı rol de oynar. Heterotropik enzimlerde ise enzim, subst-

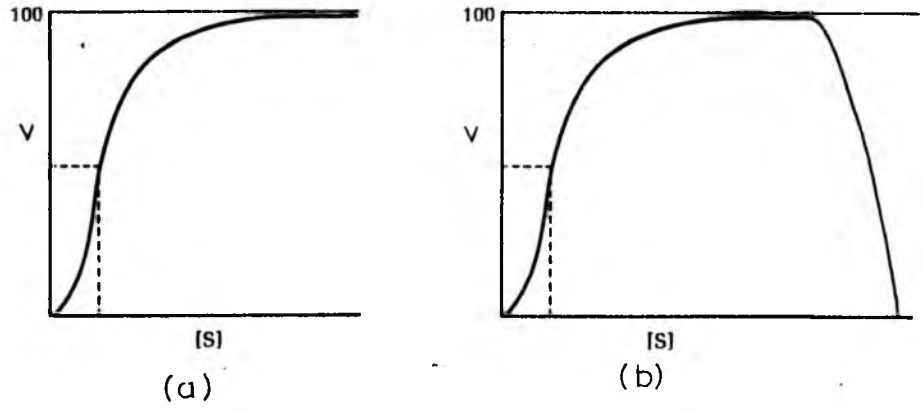
rattan başka bileşikler tarafından etkilenmektedir. Meselâ L-treonin deaminazın son ürün L-izolösin tarafından inhibisyonu gibi. Bazı multivalan allosterik enzimlerde iki veya daha fazla modülatörden birisi o enzimin substratı olabilir. Bu tip enzimler hem homotropik, hem de heterotropiktir.

5.13. ALLOSTERİK ENZİMLERİN KİNETİĞİ

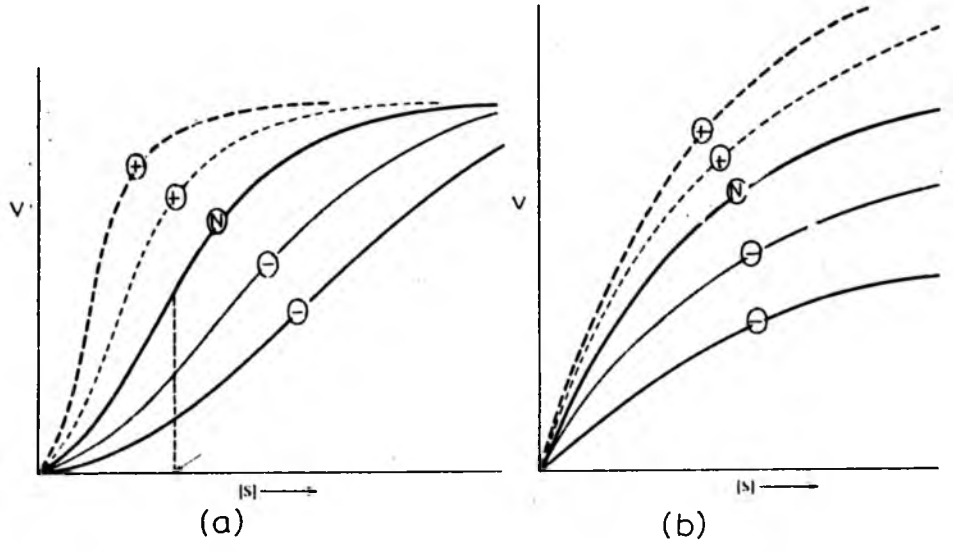
Allosterik enzim kinetiğinin klasik Michealis-Menten davranışının dışına çıktığını yukarıda söylemiştik. Bunların v-[S] eğrilerinin şekilleri homotropik veya heterotropik olmalarına bağlıdır. Fakat genelleme yapmak tam doğru değildir. Bilindiği gibi Michaelis-Menten ifadesinin v-[S] eğrisi hiperboliktir. Homotropik düzenleyici enzimlerin v-[S] eğrisi ise sigmoid yapıdadır (Şekil 5.12). Eğrinin sigmoid hali ilk bağlanan substratın, ikincisinin bağlanmasını kolaylaştırdığını ve bu suretle aktiviteyi artırdığını gösterir. Bazen bu eğriler çok diktir; substratın konsantrasyonundaki az bir artış, kataliz hızında büyük bir yükselmeye sebep olur.

Homotropik enzimler artan substratın konsantrasyonuna karşı üç çeşit davranış gösterirler. Bazılarında enzimin substrata afinitesi artar ve bunun sonucu olarak da K_M azalırken V_{max} değişmez (Şekil 5.12.a). Bazılarında ise, maksimum hıza erişildikten belirli bir substrat konsantrasyonu sonrası substrat, bir inhibitör gibi davranarak hızı azaltır (Şekil 5.12.b). Az sayıdaki bazı homotropik enzimlerde ise afinite yani K_M aynı kalırken V_{max} değişir.

Şekil 5.13'de heterotropik allosterik enzimlerin v-[S] eğrileri gösterilmektedir. Modülatörler aktivasyon veya inhibisyon etkilerini ya K_M veya V_{max} 'u değiştirerek gösterirler. Burada da bir genellemeyapma imkânı yoktur, çünkü her allosterik enzimin kendine has kinetik davranışı vardır.



Şekil 5.12. Homotropik allosterik enzimler için v-[S] eğrileri: **(a)** Sigmoid eğri; bir substratın bağlanması ikincisini kolaylaştırır, **(b)** Fazla substrat konsantrasyonunda inhibisyon gözlenir.



Şekil 5.13. Heterotropik allosterik enzimler için v-[S] eğrileri: **(a)** Pozitif veya negatif modülatör, enzimin substrata afinitesini (K_M) değiştirir ve V_{max} aynı kalır, **(b)**Modülatör afiniteye etki etmeksizin V_{max}'u değiştirir.

Modülatörün etki tarzlarından şöyle bir soru ortaya çıkmaktadır: Acaba bir modülatör kendi spesifik bölgesine bağlandıktan sonra, bağlandığı yer aktif bölgeden çok uzakta olduğu halde aktiviteyi nasıl etkiler? Bu konuda çeşitli teoriler ileri sürülmüştür. Hepsinin birleştiği nokta şudur: Modülatörün kendi bölgesine bağlanması, allosterik enzimin üç boyutlu yapısında konformasyonal değişmelere sebep olur. Ortaya çıkan yapı, katalitik yönden ya daha aktiftir veya daha zayıftır.

5.14. ENZİMLERİN BAŞKA KONTROL MEKANİZMALARI

Hücre içi reaksiyonları, allosterik enzimler tarafından düzenlenmelerinin yanısıra başka kontrol mekanizmaları tarafından da etkilenirler. Bunların başlıcalarını zimojen aktifleşmesi, kovalent modifikasyon, hormonlar olarak sayabiliriz.

Zimojen aktifleşmesi: Biyolojik sistemlerde bazı proteinler inaktif ön bileşikler halinde sentezlenmekte ve daha sonra bir veya birkaç peptid bağının proteolitik enzimler tarafından hidrolizlenmesi sonucu aktif hali kazanmaktadırlar. Eğer aktif haldeki protein bir enzim ise, inaktif ön bileşik haline zimojen veya proenzim adı verilir. Zimojenlerin proteolitik enzimlerle aktifleştirilmeleri olayına zimojen aktifleşmesi denilir. Proteinlerin spesifik proteolitik enzimlerle aktivasyonuna biyolojik sistemlerde sık rastlanır. Bazı örnekleri şunlardır:

1.Besinlerdeki proteinleri hidrolizleyen sindirim enzimleri mide ve pankreasta zimojenler halinde sentezlenirler. Bunlardan bazılarına Tablo 5.7'de yer verilmiştir.

2.Kan pıhtılaşması ondan fazla proteinin görev aldığı bir olaydır. Pıhtılaşma faktörleri olarak da isimlendirilen bu proteinlerin birçoğu inaktif halden aktif hale zimojen aktivasyonu ile geçmektedir. Meselâ protrombin, trombine dönüşerek aktivite kazanmakta, aynen trip-

Tablo 5.7. Mide ve pankreas zimojenleri.

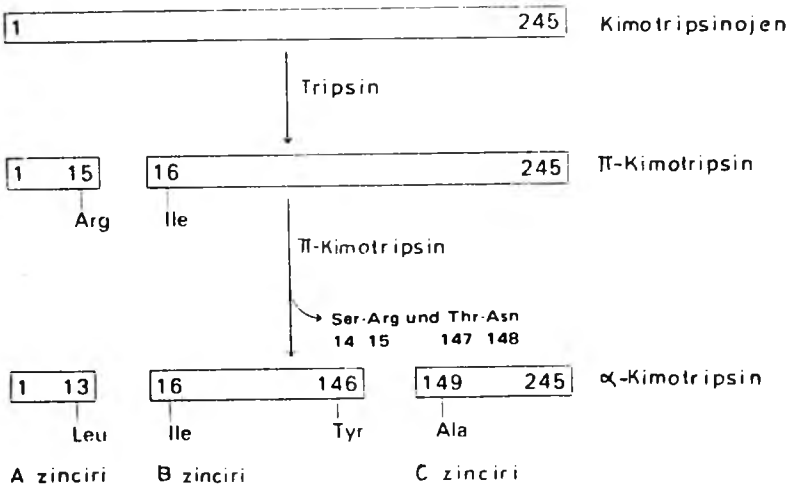
Sentez yeri	Zimojen	Aktif enzim
Mide	Pepsinojen	Pepsin
Pankreas	Kimotripsinojen	Kimotripsin
Pankreas	Tripsinojen	Tripsin
Pankreas	Prokarboksipeptidaz	Karboksipeptidaz
Pankreas	Proelastaz	Elastaz

sin gibi bir proteolitik enzim olmaktadır. Fibrinojen de bir takım peptid bağlarını kaybederek fibrine çevrilmekte ve pıhtılaşma vuku bulmaktadır.

3.Bazı protein yapısındaki hormonlar da aktif olmayan ön bileşikler halinde sentezlenmektedir. Meselâ insulin, bir peptid bağının proteolitik yolla uzaklaştırıldığı proinsulinden yapılmaktadır.

4.Deri ve kemiklerdeki kollagen fibröz proteini, çözünebilir bir ön bileşik olan prokollagenden türemektedir.

Şimdi zimojen aktivasyonuna örnek olarak kimotripsinojenin kimotripsine dönüşmesini ele alalım: Kimotripsinojen 245 amino asit ihtiva eden tek bir polipeptid zinciridir. Yapısında beş adet disülfit çarpraz bağı mevcuttur ve hiçbir enzimatik aktivitesi de yoktur. 15 nolu arginin ile 16 nolu izolösin amino asitleri arasındaki peptid bağının tripsin tarafından koparılmasıyla tam aktif hale geçer. Enzimin bu haline π-kimotripsin adı verilir. π-Kimotripsin moleküllerinden bir tanesi diğer π-kimotripsin moleküllerine etki ederek onlardan iki peptidin uzaklaştırılmasını sağlar (Şekil 5.14). Böylece enzimin kararlı hali olan α-kimotripsin ortaya çıkar. π-Kimotripsinin aktif olduğu halde niçin bir başka zimojen aktifleşmesine daha maruz kaldığı bilinmemektedir.

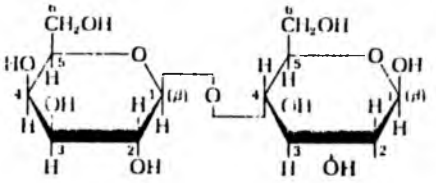


Şekil 5.14. Kimotripsinojenin aktifleştirilmesi: π- ve α-kimotripsinde bulunan zincirler birbirinden ayrılmış halde değildir; aralarında disülfid bağları vardır.

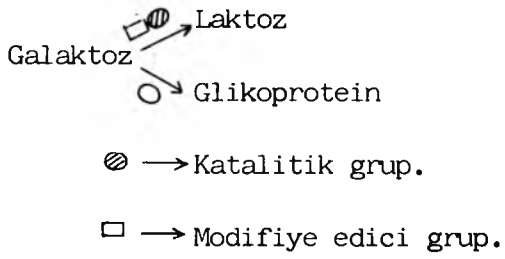
Kovalent modifikasyon: Biyolojik sistemlerde enzimatik aktiviteyi kontrol eden bir diğer mekanizma da küçük bir grubun kovalent olarak enzime bağlanması, yani enzimin bir kovalent modifikasyona uğramasıdır. Meselâ glikojenin sentez ve parçalanmasında rol alan iki enzimin aktivitesi, bir fosforil grubunun bu enzimlerin üzerindeki spesifik bir serin rezidüsüne takılması ile kontrol edilir. Her ikisi de fosforillenir; bu halde birisi aktivite kazanırken, diğeri inaktif hale geçer. Bu modifikasyon fosforil grubunun hidrolizlenmesiyle tersine çevrilebilir. Bu grupların enzimlere kovalent takılması da, başka enzimler tarafından gerçekleştirilmektedir.

Hormonlar: Bazı enzimlerin spesifikliği fizyolojik kontrol altındadır. Meselâ süt bezlerindeki laktozun sentezini ele alalım (Şekil 5.15). Bu sentezi katalizleyen laktoz sentetaz enzimi yapısında, bir katalitik grup, bir de modifiye edici grup ihtiva eder. Katalitik grup, tek

başına laktoz sentezleyemez. Onun görevi, kovalent bağlanmış karbohidrat zinciri ihtiva eden bir proteine galaktozun takılmasını katalizlemektedir. Modifiye edici grup ise, katalitik bölgenin özelliklerini değiştirerek onu galaktoza glukoz takarak laktoz sentezleyecek şekle sokar. Modifiye edici grubun seviyesi hormonal kontrol altındadır. Gebelik esnasında süt bezlerinde katalitik grup sentezlenirken,az miktarda modifiye edici grup yapılır. Doğum esnasında hormonal seviyelerde çok büyük değişmeler olur ve çok miktarda modifiye edici grup sentezlenir. Bu da katalitik grupla birleşerek büyük miktarda laktoz sentezleyen aktif laktoz sentetaz kompleksini meydana getirir. Bu sistem açık olarak bazı hormonların fizyolojik etkilerini, enzimlerin spesifikliklerini değiştirerek gösterdiklerini ortaya çıkarmaktadır.



Laktoz (galaktoz+glukoz)



Şekil 5.15. Bir glukoz ve bir galaktoz biriminden ibaret olan laktoz, bir katalitik bir de modifiye edici grup ihtiva eden laktoz sentetaz enzimi tarafından sentezlenir. Yalnız katalitik grup olduğu zaman enzim başka bir reaksiyon katalizler.

5.15. İZOENZİMLER (İZOZİMLER)

Bir canlı türünde aynı reaksiyonu katalizleyen ve farklı kimyasal yapıya sahip enzimlere izoenzim adı verilir. İzoenzimler farklı aktivitelere sahip, substrat, kofaktör ve inhibitörlere afiniteleri değişik olabilir. İzoenzimleri en çok incelenen enzim, laktat dehidrogenaz (LDH) enzimidir. Elektroforetik çalışmalar bu enzimin beş tane izoenzimi olduğunu göstermiştir. Herbiri dört polipeptid birimi ihtiva eder. İki çeşit polipeptid birimi vardır: Birisi H ile gösterilen ve yürek LDH'ında rastlanan birim, diğeri ise M sembolüne sahip kas LDH'ında görülen birimdir. İki birimden 5 çeşit 4 alt birimli izoenzim oluşabilir: HHHH, HHHM, HHMM, HMMM, MMMM. Hayvanların farklı dokularında bu enzimlerin beşine de rastlanmıştır.

Bugün birçok enzimin izoenzimleri bilinmektedir. Bunların çoğu farklı polipeptid zincirlerinin değişik kombinasyonundan ibarettir. Birçok allosterik enzimlerin de, allosterik modülatörlerine karşı farklı duyarlılıkta iki veya daha fazla izoenzimleri vardır.

6. BÖLÜM: K A R B O H İ D R A T L A R

Şimdi, canlı organizmaların besin maddelerinden birini, belki de en önemlisini oluşturan kimyasal bileşikleri inceleyeceğiz. Şekerler veya sakkaritler olarak da isimlendirilen bu grup bileşikler $(CH_2O)_n$ kaba genel formülüyle gösterilen karbonun hidratlanmış şeklini ve bunların türevlerini kapsar. Karbohidratların polihidroksi aldehit veya keton yapısındaki moleküllerinin en küçük birimine monosakkaritler adı verilir. Tabiatta en bol bulunan monossakkarit, altı karbonlu bir şeker olan D-glukozdur. Diğer bütün şeker molekülleri D-glukozdan türemiştir ve canlıların bünyelerinde bulunan polisakkaritlerin tamamına yakını bu molekülün polimerleridir.

İki ile on monosakkarit biriminin glikozid bağlarıyla oluşturdukları bileşiklere oligosakkaritler adı verilir. Polisakkaritler ise, yine monosakkaritlerin meydana getirdikleri lineer veya dallanmış uzun zincirlerdir. Birçoğu yalnız bir çeşit şeker alt biriminden ibaret iken, bazıları iki çeşit monosakkarit biriminin sıra ile zincir üzerinde yer almasıyla hasıl olurlar.

Biosferde en bol bulunan organik bileşik karbohidratlardır; çünkü birer polisakkarit olan nişasta ve selüloz, bitkilerin en önemli depo ve yapıtaşı maddeleridir. Polisakkaritler aynı zamanda bakteri ve bitki hücre duvarlarının ve hayvan dokularındaki yumuşak hücre çeperlerinin önemli bir bileşenini teşkil ederler.

Bu bölümde önce monosakkaritlerin yapı, özellik ve türevleri ele alınacak, müteakiben önemli bazı disakkaritler ve polisakkaritler anlatıldıktan sonra, polisakkarit bileşenlere sahip olan bakteri, bitki ve bazı hayvan hücre çeperleri izah edilecektir.

6.1. MONOSAKKARİTLER

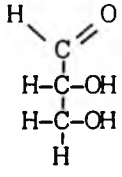
Monosakkaritler, $(CH_2O)_n$ genel formülünde dallanma-

mış, biri dışında her karbon atomu üzerinde bir hidroksil grubu ve bir karbonunda da karbonil oksijeni taşıyan bileşiklerdir. Burada n=3 veya daha büyük değerler alabilir. Eğer karbonil oksijeni zincir sonunda ise, bileşik bir aldehittir ve aldoz adını alır; eğer bir başka yerde ise monosakkarit bir ketondur ve ketoz diye isimlendirilir. Karbon zincirinin uzunluğuna göre, üç, dört, beş altı, yedi ve sekiz karbon atomuna sahip monosakkaritler sırasıyla, triozlar, tetrozlar, pentozlar, heksozlar, heptozlar ve oktozlar şeklinde isimlendirilir.

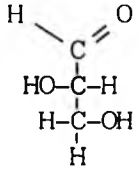
En basit monosakkaritler bir aldotrioz olan gliseraldehid , bir ketotrioz olan dihidroksiasetondur. Şekil 6.1 ve 6.2'de D-aldoz ve D-ketozların bazı üyelerinin yapıları verilmiştir. Her iki sınıf monosakkaritler içerisinde tabiatta en bol bulunan heksozlardır. Bununla beraber pentozlar nükleik asitlerin önemli bileşenleri, triozlar da karbohidrat metabolizmasının mühim ara bileşikleridir. Bütün basit monosakkaritler beyaz kristal yapıdadır, suda kolayca çözünebilirken, apolar çözücülerde çözünmezler. Lezzetleri tatlıdır.

6.1.a. Monosakkaritlerde Stereoizomerlik

Dihidroksiaseton dışında bütün monosakkaritler, bir veya daha fazla sayıda asimetrik karbon atomu* ihtiva ederler. En basit aldoz olan gliseraldehid, yalnız bir tane asimetrik karbon atomu ihtiva ederken, aşağıda gösterildiği gibi, iki izomeri vardır:

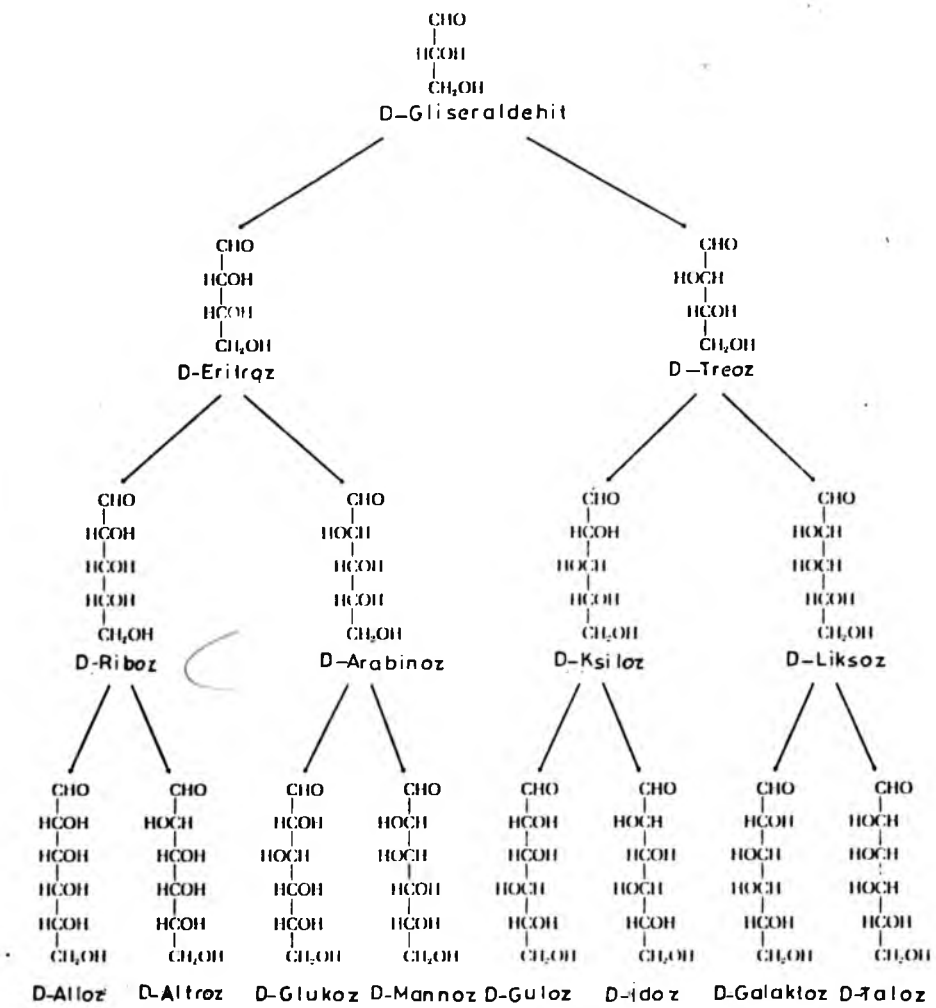


D-(+) Gliseraldehit
$[\alpha]_D^{20}=13,5°$

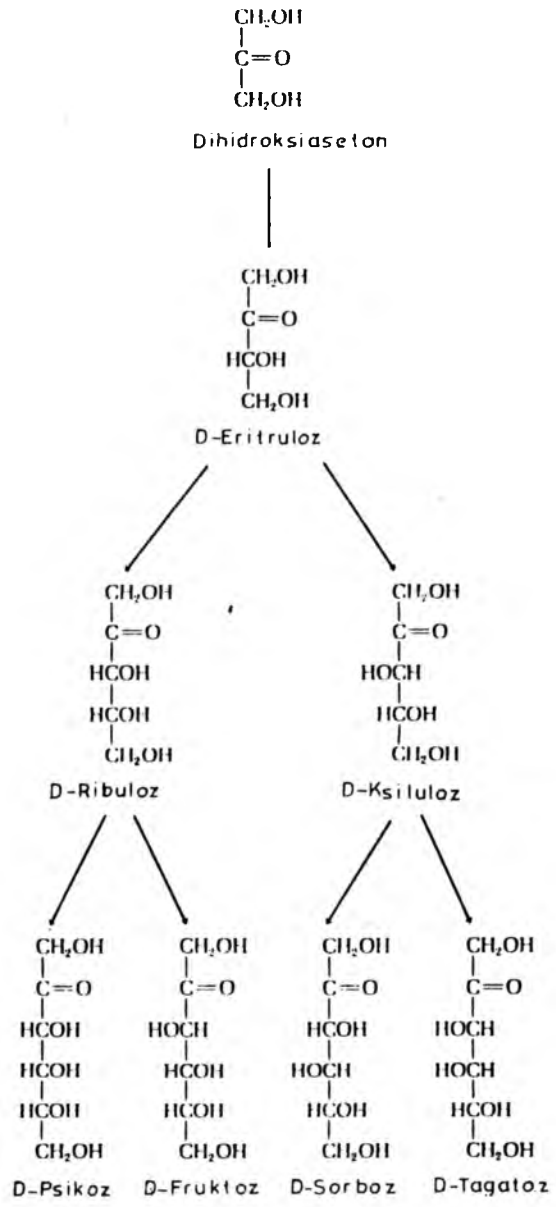


L-(-) Gliseraldehit
$[\alpha]_D^{20}=-13,5°$

*Asimetrik karbon atomu= Dört bağıyla da farklı gruplara bağlanmış karbon atomu.

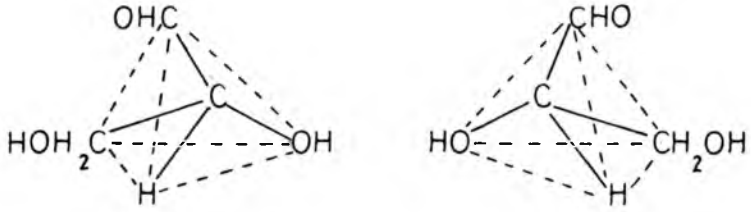


Şekil 6.1. Üçten altı karbona kadar D-aldozların açık zincirli yapı formülleri.

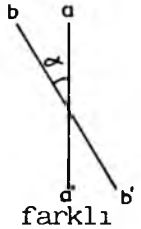


Şekil 6.2. Üçten altı karbona kadar D-ketozların açık zincirli yapı formülleri.

Gliseraldehidin 1 nolu karbonu tetrahedral değildir. 3 nolu karbon ise tetrahedral olmasına rağmen asimetrik değildir. Eğer gliseraldehidin iki izomeri de asimetrik karbon merkezde olmak üzere dört ayrı bağ bir tetrahedronun köşelerine yöneltilerek çizilirse, iki yapının çakışmadığı görülür, yani her ikisi de farklı bileşiktir (enantiomerler).



Asimetrik karbon atomuna sahip birçok bileşikler optikçe aktiftirler, yani polarize ışık* düzlemini çevirme özelliğine sahiptirler. Meselâ sayfa düzleminden dik olarak çıkan bir polarize ışık demeti, aa' yönünde optikçe aktif bir maddenin içinden geçtiği zaman, titreşim düzlemi maddeyi bb' yönünde terkeder. Yani düzlem α açısı kadar çevrilir.



Gliseraldehidin iki farklı izomerinden geçen polarize ışık, eşit büyüklükte fakat ters yönlerde ($+\alpha$, dextro-sağa/$-\alpha$, levo-sola) çevrilir. Optikçe aktiflik polarimetre adı verilen cihazlarla ölçülür.

Polarize ışık düzleminin çevrilme miktarı, bileşiğin çeşit ve konsantrasyonuna, ışığın dalga boyuna, ışık yolunun uzunluğuna, çözücünün cinsine ve sıcaklığına bağlıdır. Optikçe aktiflik kantitatif olarak spesifik çevrilme ($[\alpha]^T_\lambda$) şeklinde ifade edilir:

---

*Polarize ışık= Titreşimleri yalnız bir düzlem üzerinde olan ışık demeti.

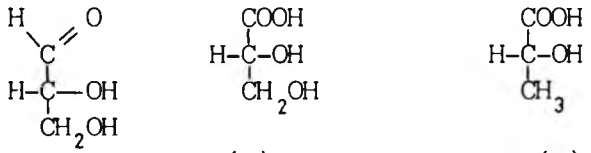
$$[\alpha]^{T}_{\lambda} = \frac{\text{Gözlenen çevirme x 100}}{\text{Optik yol uzunluğu (dm)x Konsantrasyon (g/100 ml)}}$$

Sıcaklık (T) ve ışığın dalga boyu (λ) verilmelidir. Genelde sıcaklık olarak 20°C ve ışığın dalga boyu olarak sodyumun D-çizgisi (589,3 nm) alınır.

Örnek: Mililitresinde 10 mg glukoz ihtiva eden bir çözelti 20 °C'da, 10 cm lik bir polarimetre tübünden 0,525°'lik bir dönme göstermiştir. Spesifik çevrilmeyi hesaplayınız.

$$[\alpha]^{20}_{D} = \frac{0,525x100}{1 \text{ dm x } 1g} = +52,5°$$

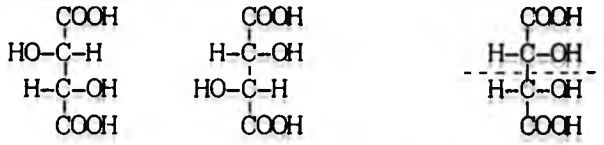
Şekerler, amino asitler ve diğer optikçe aktif bileşiklerin atomlarının uzaydaki konfigürasyonları, gliseraldehid izomerlerine göre isimlendirilmektedir. Polarize ışığı sağa çeviren gliseraldehide benzeyenler D-, sola çeviren gliseraldehide benzeyenler L-izomerleri olarak gösterilir. Burada D- ve L- mutlak uzaysal konfigürasyonun ifadesi olup, optik çevirmenin yönünü belirtmez. Çünkü D serisinde olup da polarize ışığı sola çeviren bileşikler vardır. Meselâ, D-gliserik asit ve D-laktik asit.



D-(+)Gliseraldehid D-(-)Gliserik asit D-(-)Laktik asit.

Eğer bir maddenin çözeltisinde eşit miktarda D- ve L- izomerlerinden bulunursa, her iki yöndeki optik çevirmeler birbirini götüreceğinden optikçe aktiflik gözlenmez. Böyle eşit miktardaki D- ve L-karışımlarına rasemik karışım adı verilir. Asimetrik karbon atomuna sahip bazı bileşiklerde, molekül içinde karşılıklı çevir-

melerin birbirlerini götürmesi sonucu, optikçe aktiflik göstermezler. Mezo bileşikler olarak da isimlendirilen bu tip maddelere en klasik örnek mezo-tartarik asittir. Bu molekülün üst yarısıyla alt yarısı birbirlerinin ayna görüntüsüdür. Bundan dolayı bir asimetrik karbonun optikçe aktifliği, diğer karbon atomunun eşit ve zıt çevirmesi tarafından götürülmektedir.



D-Tartarik asit L-Tartarik asit mezo-Tartarik asit

Bileşiklerde birden fazla asimetrik karbon atomu mevcutsa, o bileşiğin optik izomerlerinin sayısı 2^n'e eşittir ve n, asimetrik karbon sayısını gösterir, Meselâ aldoheksozların 4 asimetrik karbonu olduğundan, $2^4 = 16$ tane izomeri vardır. Bunlardan yarısı D-, yarısı da L-serisindedir. D-Serisindeki (Şekil 6.1) aldoheksozların karbonil karbonuna en uzak asimetrik karbon (5 nolu karbon) üzerindeki grupların dizilişi D-gliseraldehide benzediğinden D-izomeri olarak sınıflandırılmışlardır. L-İzomerleri de L-gliseraldehide benzerlik göstermektedir. Aldozların içerisinde biyolojik yönden en önemli olanlar , D-gliseraldehid, D-riboz, D-glukoz, D-mannoz ve D-galaktozdur. Ketozlar içerisinde ise tabiatta en çok dihidroksiaseton, D-ribuloz ve D-fruktoza tesadüf edilir. L-Şekerlere biyolojik sistemlerde nadiren rastlanır. En önemlileri L-fukoz, L-ramnoz ve L-sorbozdur.

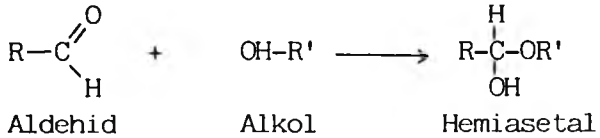
Yalnız bir karbon atomu üzerindeki konfigürasyonunda farklılık bulunan iki monosakkaride epimer adı verilir. D-Glukoz ve D-mannoz 2 nolu karbon atomlarına, D-glukoz ve D-galaktoz 4 nolu karbon atomlarına göre birbirlerinin epimerleridir.

6.1.b. Monosakkaritlerin Anomerik Şekilleri

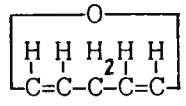
Birçok monosakkaritler sulu çözeltilerde, Şekil 6.1

ve 6.2'de gösterilen zincir yapılarındaki asimetrik karbon sayısından bir fazla asimetrik merkez ihtiva ediyormuş gibi davranırlar. Meselâ D-glukoz iki izomere sahiptir; ∝-D-glukoz ($[\alpha]_D^{20}$=112,2°) ve β-D-glukoz ($[\alpha]_D^{20}$ = 18,7°). D-Glukozun bu izomerleri suda çözündükleri zaman herbirinin optik çevrilmesi zamanla tedricen değişir ve son bir denge değerine, yani $[\alpha]_D^{20}$=52,7°'ye yaklaşır. Bu değişmeye mutarotasyon adı verilir ve izomerlerin denge konsantrasyonlarına erişme eğilimlerinden ortaya çıkmaktadır.

D-Glukozun ∝- ve β-izomerleri Şekil 6.1'deki gibi bir açık zincir yapısında değildir. Glukozun 5 nolu alkolik hidroksil grubu ile 1 nolu aldehid grubu arasında reaksiyon sonucu hemiasetal teşekkül eder. Sonunda altı atomdan ibaret piran halkası meydana gelir. Bu yüzden

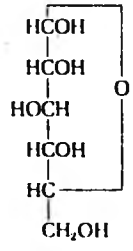


Aldehid Alkol Hemiasetal

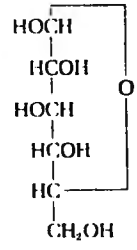


Piran

∝-D-glukozun sistematik adı ∝-D-glukopiranozdur.



∝-D-Glukoz

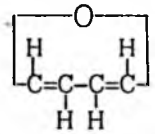


β-D-Glukoz

Görüldüğü gibi, 1 nolu karbon, hemiasetal reaksiyonu sonucu asimetrik merkez haline gelmiştir. Bundan dolayı D-glukoz,∝- ve β- ile gösterilen iki izomer şekline girmiştir. Monosakkaritlerin hemiasetal karbonu üzerindeki konfigürasyondan ortaya çıkan izomerik şekillerine anomer

adı verilir ve hemiasetal karbonu da anomerik karbon ismini alır. Yalnız beş veya daha fazla sayıda karbon atomu ihtiva eden monosakkaritler, kararlı halkalar oluşturabilir ve anomerik yapılara sahip olabilir. Tetroz ve triozlar, sulu çözeltilerde açık zincir yapısındadır.

Ketoheksozlar da ∝- ve β- anomerik şekillere sahiptir. Bu bileşiklerde 5 nolu karbondaki alkolik hidroksil grubu, 2 nolu karbondaki karbonil grubuyla reaksiyona girerek hemiketal oluştururlar. Bunun sonucu olarak ta 5 karbonlu bir halka meydana gelir. Bu bir furan halkasıdır ve ketoheksoz da furanoz adını alır.

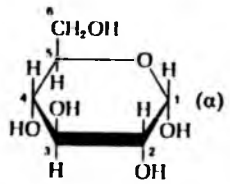


Furan

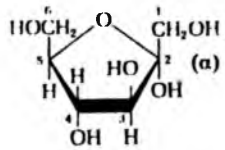
Heksozların açık zincir formlarının, ∝- ve β-anomerik yapılar arasında ara geçiş hali olduğuna inanılmaktadır. D-Şeker serisinde ∝- ve β- formları, anomerik karbon üzerinde -OH'ın sırasıyla sağa veya sola yazılmasıyla gösterilir.

6.1.c. Monosakkaritlerin Haworth Formülleri

Haworth, karbohidrat yapılarını göstermek üzere bir sistem geliştirdi. Bu sistemde halka kağıt düzleminden dışarıya dik olarak gelmekte ve halkadaki karbon atomlarına takılı gruplar halka düzleminin üst ve altında yer almaktadır. ∝-D-Glukoz ve ∝-D-fruktoz moleküllerinin Haworth formülleri aşağıda gösterilmiştir. Kalın çizgiler okuyucuya yakın kısımlardır.



∝-D-Glukoz

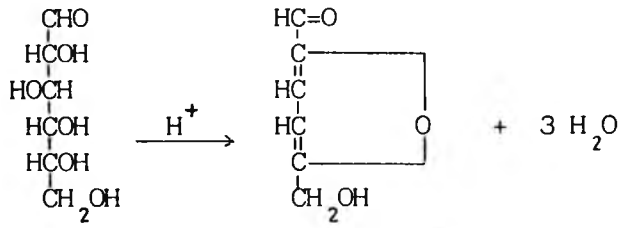


∝-D-Fruktoz

Haworth yapıları halkaların gerçek uzaysal konfigürasyonunu aksettirmemektedir. Çünkü piranoz ve furanoz halkaları bir düzlem şeklinde değildir. Piranoz halkalarının iki konfigürasyonu vardır: koltuk ve kayık. Koltuk şekli daha kararlıdır. Fakat şeker moleküllerinin biyokimyasal reaksiyonlarını verirken Haworth formülleri bizlere yeterli olduğundan koltuk ve kayık şekilleri üzerinde teferruata inmeyeceğiz.

6.1.d. Monosakkaritlerin Asit ve Bazlarla Etkileşmeleri

Monosakkaritler, sıcak ve seyreltik mineral asit (HCl, HNO_3, H_2SO_4 gibi) çözeltilerinde kararlıdır. Bu yüzden polisakkaritlerin hidrolizi sonucunda, monosakkaritler bozulmadan kalırlar. Derişik asit çözeltilerinde, şekerler dehidratasyona maruz kalarak, furanın aldehid türevi olan furfuralleri verirler.



D-Glukoz 5-Hidroksimetilfurfural

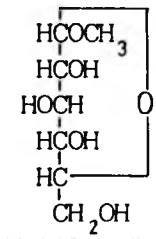
Seyreltik baz çözeltileri, monosakkaritlerin anomerik karbonu ve ona komşu karbon atomu çevresinde yeni düzenlemelere sebep olur. Diğer karbon atomları substitüentlerinde değişiklik olmaz. Meselâ D-glukoz, seyreltik alkali ile muamele edildiğinde D-glukoz, D-fruktoz ve D-mannoz denge karışımı ortaya çıkar.

Yüksek sıcaklıkta ve derişik alkali konsantrasyonlarında serbest monosakkaritler, daha ileri seviyede bir değişikliğe, parçalanmaya ve hatta polimerleşmeye de maruz kalabilirler. Glikozidler ve bazı polisakkaritler bazlara karşı dayanıklıdır.

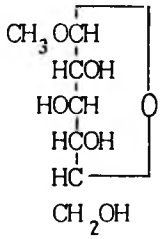
6.2. MONOSAKKARİTLERİN ÖNEMLİ TÜREVLERİ

6.2.a. Glikozidler

Mineral asitli bir ortamda aldoheksozlar, alkollerle reaksiyona girerek anomerik α- ve β-glikozidleri teşkil ederler. Glikozidler asimetrik karışık asetallerdir ve aldoheksozun aldehid karbonunun bir başka alkole ait hidroksil grubuyla etkileşmesi sonucu ortaya çıkar. Glikozidlerdeki aldehid karbonu asimetriktir. Glukoz metanolle metil-α-D-glukozid($[\alpha]_D^{20}=+158,9°$) ve metil-β-D-glukozid($[\alpha]_D^{20}=-34,2$) ürünlerini verir.



Metil-α-D-glukozid



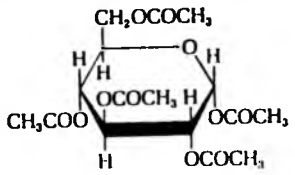
Metil-β-D-glukozid.

Glikozid bağları bir monosakkarit ile bir diğer monosakkaridin hidroksil grupları arasında da vuku bulur. Bunun sonucu olarak ta disakkaritler hasıl olur. Polisakkaritler de bu çeşit glikozid bağlarıyla birçok monosakkaridin uzun zincirler oluşturmasıyla ortaya çıkar. Bu bağlar bazlara karşı dayanıklı iken, kaynar asit çözeltilerinde serbest monosakkarit ve alkole hidrolizlenir. Glikozidler aynı zamanda enzimler tarafından da çok spesifik olarak parçalanırlar.

6.2.b. O-Açil Türevleri

Monosakkarit ve polisakkaritlerin serbest hidroksil grupları, O-açil türevleri vermek üzere açillenebilir. Bu reaksiyondan yapı belirlenmesinde istifade edilir. Meselâ, α-D-glukoz aşırı miktarda asetik anhidridle muamele gördüğü zaman penta-O-asetil-α-D-glukoz teşekkül eder. Bir monosakkaridin bütün hidroksil grupları, farklı

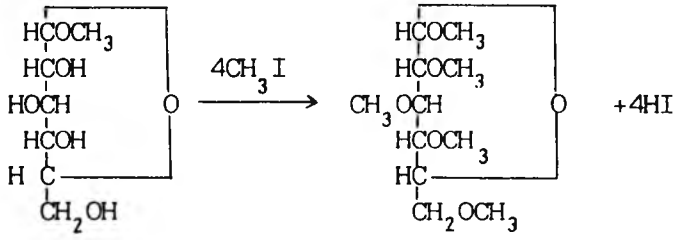
reaksiyon aktiflikleri olmasına rağmen açillendirilebilirler. Bu şekilde oluşan esterler tekrar hidroliz olabilir.



Penta-O-asetil-α-D-glukoz

6.2.c. O-Metil Türevleri

Monosakkaritlerin anomerik karbon atomlarının metanolle birleşip glikozidleri oluşturduklarını yukarıda görmüştük. Diğer hidroksil gruplarının metillenmeleri ise, daha değişik şartlarda, meselâ AgO mevcudiyetinde dimetil sülfat veya metil iyodürle muamele sonucu gerçekleşir. Bu durumda metil asetalleri (metillenmiş anomerik karbon gibi) değil, metil eterleri oluşur. Metil asetalleri kaynar asit çözeltisinde kolayca hidrolizlenebilirken, metil eterleri etkilenmezler. Bir monosakkarit üzerindeki tüm hidroksil grupları metillenebilir. Bu yolla şeker molekülleri substitüentlerinin pozisyonları hakkında fikir elde edilir.

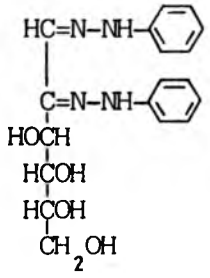


Metil-α-D-glukozid Metil-2,3,4,6-tetra-O-metil-α-D-glukozid

6.2.d. Fenilosazonlar

Monosakkaritler 100°C sıcaklıkta ve seyreltik asit

çözeltisinde, aşırı fenilhidrazin ile reaksiyona girerek fenilosazonları teşkil ederler. Bu bileşikler suda çözünmediğinden kolayca kristallenir. Aşağıda D-glukoz fenilosazonun yapısı verilmiştir.



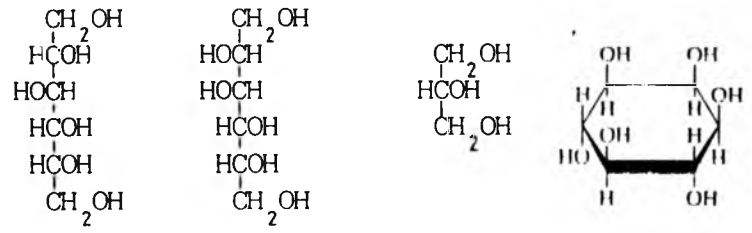
D-Glukoz fenilosazon

Glukoz, fruktoz ve mannoz, aynı fenilosazonları verirler, çünkü reaksiyon esnasında 1. ve 2. karbon atomları üzerindeki konfigürasyon farkları ortadan kalkmaktadır. Bu bileşiklerden bazen şekerlerin ayırdedilmesinde yararlanılmaktadır.

6.2.e. Şeker Alkolleri

Monosakkaritlerin karbonil grupları, metal katalizörlerin mevcudiyetinde H_2 gazı ile indirgenmesi sonucu şeker alkolleri oluşur. Meselâ D-glukozun indirgenmesiyle sorbitol, D-mannozun indirgenmesiyle de mannitol teşekkül eder. Bu reaksiyonlar enzimler tarafından da yürütülebilmektedir.

Şeker alkollerinden gliserol ve inositol, tabiatta en bol bulunanlardan olup, birincisi üç karbonlu zincir, ikincisi ise siklohekzan türevi halinde ve çeşitli stereoizomerik şekillerde bulunur. İnositol, fosfolipidlerin yapısında olmanın yanısıra, fitik asit adı verilen hekzofosforik esterinin kalsiyum ve magnezyum tuzları halinde yüksek bitki dokularının ekstraselüler destek materyalinde de bulunurlar. Aşağıda bazı şeker alkollerinin yapı formülleri verilmiştir:



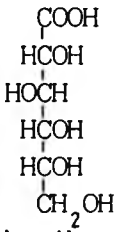
Sorbitol D-Mannitol Gliserol İnositol

6.2.f. Şeker Asitleri

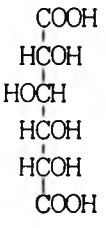
Üç tip şeker asidi vardır: aldonik,aldarik ve uronik asit. Aldozlar zayıf oksitleyici ajanlarla reaksiyona girdikleri zaman, karbonil karbonunun yükseltgenmesi sonucu aldonik asitler adı verilen karboksil asitleri oluşur. Meselâ D-glukozun oksitlenmesiyle, fosforillenmiş hali karbohidrat metabolizmasında önemli olan D-glukonik asit teşekkül eder.

Eğer nitrik asit gibi kuvvetli bir oksitleyici ile muamele edilirse, hem aldehit karbonu hem de uçtaki hidroksil karbonu karboksil gruplarına yükseltgenir ve aldarik asitler (sakkarik asitler de denir) meydana gelir. D-Glukozun böyle bir türevi D-glukarik asit adını alır. Aldarik asitlerin biyolojik önemi olmamakla birlikte şekerlerin teşhisinde yararlanılır.

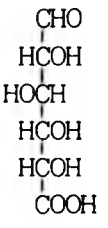
Üçüncü tip şeker asitlerinden olan uronik asitler, biyolojik yönden büyük ehemmiyete haizdirler. Bu bileşiklerde yalnız primer hidroksil karbonu karboksil grubuna yükseltgenmiştir. D-Glukozun uronik asit türevi, D-glukuronik asittir. Diğer önemli uronik asitler ise, D-galakturonik ve D-mannuronik asitlerdir. Uronik asitler birçok polisakkaritlerin bileşenleridir. Aşağıda D-glukozun şeker asidi türevleri verilmiştir:



D-Glukonik asit

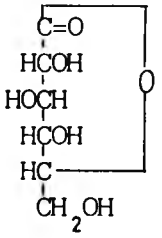


D-Glukarik asit

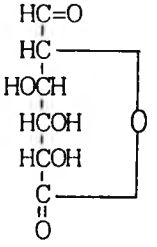


D-Glukuronik asit

Aldonik ve uronik asitler umumiyetle beş veya altı atomlu ve lakton adı verilen yapılar halinde bulunurlar. Meselâ D- δ -glukonolakton ve D-δ-glukuronolakton bileşiklerinin lakton şekilleri aşağıdaki gibidir:

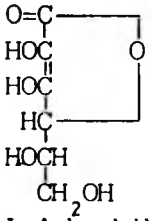


D-δ-Glukonolakton

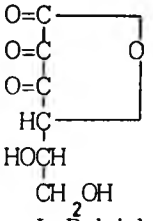


D-δ-Glukuronolakton

En önemli şeker asitlerinden birisi de vitamin C olarak bilinen askorbik asittir. Çok kararsız bir bileşik olup, kolayca dehidroaskorbik aside oksitlenir. Vitamin C'nin eksikliği insanlarda skorbit hastalığına sebep olur. Turunçgillerde çok bol bulunur.



L-Askorbik asit

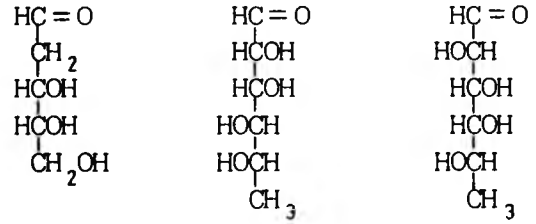


L-Dehidroaskorbik asit

Monosakkaritlerin kantitatif tayini, genellikle alkali ortamda Cu^{+2}, Ag^{+} ve ferrisiyanür tarafından oksitlenmesi prensibine dayanır.

6.2.g. Deoksi Şekerler

Tabiatta en bol bulunan deoksi şeker, DNA moleküllerinin bileşeni olan 2-deoksi-D-ribozdur. L-Ramnoz (6-deoksi-L-mannoz) ve L-fukoz (6-deoksi-L-galaktoz) bileşikleri de bazı bakteri duvarlarının önemli bileşenleridir.



2-Deoksi-D-riboz L-Ramnoz L-Fukoz

6.2.h. Amino Şekerler

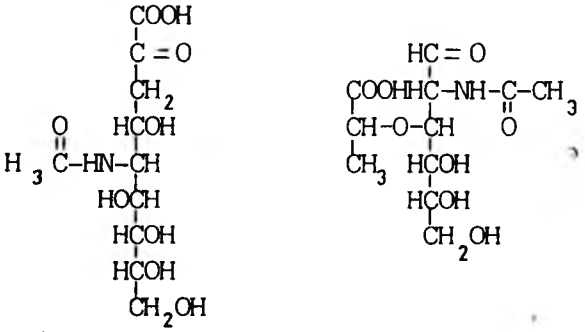
D-Glukozamin ve D-galaktozamin en yaygın amino şekerlerdir. Bu bileşiklerde 2 nolu karbon üzerindeki OH grubu $-NH_2$ ile yer değiştirmiştir. D-Glukozamin omurgalı dokularındaki birçok polisakkaritlerde bulunurken, böcek ve kabuklu hayvanların yapısal polisakkaridi olan chitin (kitin)'in önemli bir bileşenidir. D-Galaktozamin ise, kıkırdağın başlıca polisakkaridi olan kondroitin sülfatın ve glikolipidlerin bir bileşenidir.

D-Glukozamin D-Galaktozamin

6.2.ı. Müramik ve Nöraminik Asitler

Bu şeker türevlerinden müramik asit, bakteri hücre

duvarlarının ve nöraminik asit de yüksek hayvan hücreleri çeperinin önemli yapı taşlarını teşkil ederler. Her ikisi de dokuz karbonlu şeker türevidir ve altı karbonlu amino şekerine üç karbonlu şeker asidinin bağlanmış halidir. Amino grupları umumiyetle asetillenerek N-asetil müramik asidi ve N-asetil nöraminik asidi oluştururlar. Nöraminik asidin N-açil türevleri genel olarak sialik asitler olarak isimlendirilir.



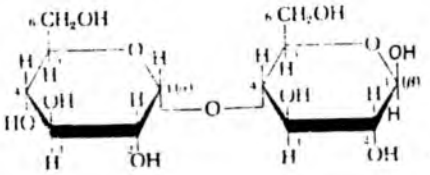
N-Asetil nöraminik asit N-Asetil müramik asit

6.3. DİSAKKARİTLER

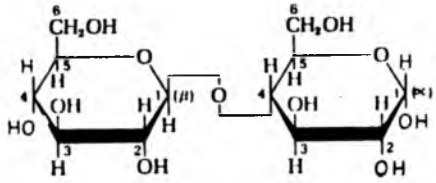
Bilinen disakkaritler içinde en önemlileri maltoz, laktoz ve sukrozdur. Maltoz iki tane D-glukoz molekülünün glikozid bağıyla birleşmesi sonucu ortaya çıkar. Bağ, moleküllerden birisinin 1 nolu α-anomerik karbonuyla diğerinin 4 nolu karbonu arasında oluşmaktadır. İkinci glukoz molekülünün anomerik karbonu serbest halde olup, genellikle β-formundadır ve şeker indirgeyici özelliğe sahiptir. Oluşan glikozid bağı $\alpha(1\longrightarrow4)$ sembolü ile gösterilirken, adı da 4-O-α-D-glukopiranozil-β-D-glukopiranoz şeklinde yazılır.

Sellobiyoz ve gentiyobiyoz da iki D-glukoz biriminden ibaret olan disakkaritlerdir. Sellobiyoz, selüloz polisakkaritinin $\beta(1\longrightarrow4)$ glikozid bağlarıyla tekrarlanan disakkarit birimi iken, gentiyobiyoz da $\beta(1\rightarrow6)$ bağlarına sahiptir. Her ikisinin de indirgeyici özellikte serbest

anomerik grupları vardır.



Maltoz (β-şekli)

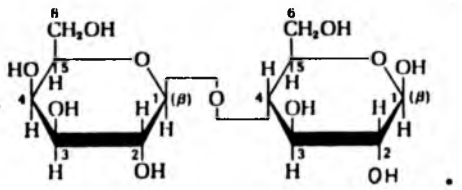


Sellobiyoz (∝-şekli)

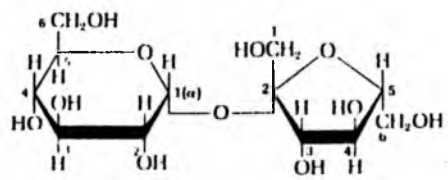
Laktoz ise, tabiatta yalnız sütte bulunur. D-Galaktaz ve D-glukoz birimlerinin β(1⟶4) glikozid bağlarıyla birleşmesi sonucu oluşur. Glukoz, üzerinde serbest anomerik karbona sahip olduğundan indirgeyici bir şekerdir.

Sukroz ise, bizim hergün kullandığımız şeker pancarı ve kamıştan elde edilen şekerdir. Diğer disakkarit ve oligosakkaritlerin aksine serbest anomerik karbonu yoktur. Çünkü sukrozu oluşturan D-glukoz ve D-fruktoz birbirlerine anomerik karbonları üzerinden bağlanmışlardır. Sukroz bu yüzden ne hemiasetal, ne de hemiketaldır. Mutarotasyona maruz kalmamanın yanısıra osazonları vermek üzere fenilhidrazin ile de reaksiyona girmez ve indirgeyici bir şeker gibi hareket etmez. Sukrozun ($[\alpha]_D^{20}$ = 66,5°) hidrolizi sonucu, D-glukoz($[\alpha]_D^{20}$=52,5°) ve D-fruktozun ($[\alpha]_D^{20}$=-92°) meydana gelmesine inversiyon olayı denir, çünkü hidroliz sonucu eşdeğer glukoz ve fruktozun

oluşması optik çevirmeyi dekstrodan levoya değiştirir. Bu şeker karışımına da invert şeker adı verilir. Sukroz invertaz adı verilen enzimle de hidrolizlenebilir. Hidrolizlenme derecesi polarimetre ile takip edilir. Aşağıda laktoz ve sukrozun açık formülleri verilmiştir:



Laktoz (β-şekli)



Sukroz

6.4. POLİSAKKARİTLER

Polisakkaritler, birçok monosakkaritlerin veya bunların bazı türevlerinin glikozid bağı ile bağlanarak meydana getirdikleri büyük moleküllü maddelerdir. Asitler veya enzimlerle tamamen hidroliz edildikleri zaman monosakkarit birimlerine ayrılırlar. Polisakkaritlerde en bol bulunan monosakkarit birimi D-glukoz olup, D-fruktoz, D-mannoz, D- ve L-galaktoz, D-ksiloz ve D-arabinoz birimlerine de rastlanmaktadır. Tabii polisakkaritlerde bulunan monosakkarit türevlerinin başlıcaları da D-glukoza-

min, D-galaktozamin, D-glukuronik asit, N-asetil müramik asit ve N-asetil nöraminik asittir.

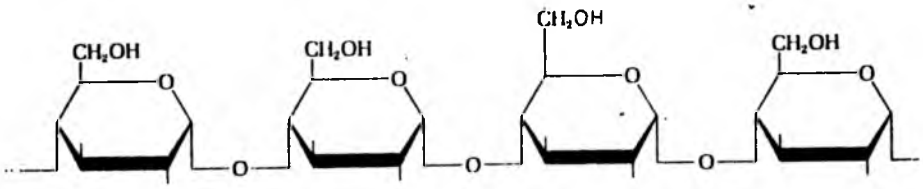
Birtek monosakkarit türünün veya türevinin birimlerini ihtiva eden polisakkaritlere homopolisakkaritler, farklı monosakkarit veya türevi birimlerini ihtiva edenlere de heteropolisakkaritler adı verilir. Polisakkaritlerin bazıları suda çözünmezler ve canlıların destek maddesidirler (selüloz gibi). Bazıları da suda kolloidal bir çözelti teşkil ederler ve yedek karbohidrat olarak görev yaparlar (nişasta gibi).

Başlıca homopolisakkaritler arasında nişasta, glikojen, dekstran, selüloz, inulin ve kitini, heteropolisakkaritler arasında da hiyaluronik asit, kondroitin sülfatlar, heparin, kan grubu polisakkaritleri, pektin ve alginik asitleri sayabiliriz. Bunlardan bulundukları organizmalarda şeker deposu görevini üslenen nişasta ve glikojen, hücre sitoplazmalarında büyük granüller halindedirler. Yarıçapları 100-400 A° olan granüller, çok sayıda polisakkarit moleküllerinin birleşmesiyle teşekkül etmişlerdir. Granüller içinde polisakkaritlerin yıkım ve sentezini gerçekleştiren enzimler ve bazı proteinler de bulunur. Glukoz fazlalığında glukoz molekülleri enzimatik olarak nişasta veya glikojen zincirlerinin uçlarına bağlanırlar, ihtiyaç anında da enzimatik olarak salıverilirler. Şimdi biraz evvel saydığımız polisakkaritlerden bazılarını ayrıntılı olarak inceleyelim.

6.4.a.Depo Polisakkaritleri

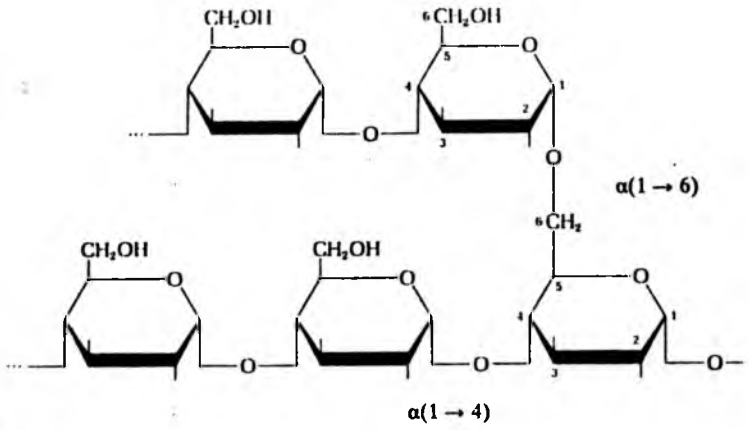
Nişasta: Tamamen D-glukoz monosakkaritlerinden oluşmuştur. α-Amiloz ve amilopektin diye adlandırılan iki şekli mevcuttur. α-Amiloz, D-glukoz moleküllerinin $\alpha(1\rightarrow4)$ glikozid bağlarıyla oluşturdukları dallanmamış bir moleküldür. Molekül ağırlıkları birkaç binden 500.000'e kadar değişir. Amiloz suda gerçek manada çözünemediği halde, hidratlanmış miseller oluşturur ve iyodla mavi renk verir. Bu misellerde polisakkarit zinciri daha önce prote-

inlerde gördüğümüz sarmal yapıya sahiptir.



∝-Amiloz

Amilopektin ise son derece dallanmış haldedir. Dallar ortalama 24-30 glukoz uzunluğundadır ve çeşitten çeşide değişebilir. Zincir omurgası ∝(1⟶4) glikozid bağlarıyla oluşturulurken, dallanmalar ∝(1⟶6) bağlarıyladır. Amilopektin de kolloidal veya miselli çözeltiler meydana getirir ve iyodla kırmızı-mor renk verir. Molekül ağırlığı bir milyona kadar çıkabilir. Amilopektinin dallanmış yapısı aşağıda gösterilmiştir.



Amiloz, enzimatik olarak ∝-amilaz enzimi tarafından hidrolizlenir. Pankreas salgısında ve tükürükte bulunan bu enzim, nişastanın sindirilmesinde görev alır ve amilo-

zu $\alpha(1\rightarrow4)$ glikozid bağlarından parçalar. Parçalanma sonucu glukoz ve maltoz karışımı oluşur. Amilazın etkisi esnasında dekstrin adı verilen orta uzunlukta polisakkaritler teşekkül eder. Amilopektinler ise, amilazlar tarafından $\alpha(1\rightarrow6)$ bağlarına kadar parçalanırlar ve ürün olarak çok dallanmış polisakkaritler (limit dekstrin) meydana gelir. $\alpha(1\rightarrow6)$ bağları dallanma noktalarından α-$(1\rightarrow6)$ glikosidaz enzimleri tarafından hidrolizlenir. α-Amilaz ve $\alpha(1\rightarrow6)$ glikosidaz enzimlerinin beraber etkileri sonucu amilopektin, glukoz ve maltoz moleküllerine kadar parçalanır.

Glikojen: Bu depo polisakkariti hayvan dokularında, özellikle karaciğer ve kaslarında bol olarak bulunur. Amilopektin gibi glikojen de D-glukoz moleküllerinin $\alpha(1\rightarrow4)$ bağlanmaları ve $\alpha(1\rightarrow6)$ dallanmaları ile teşekkül eden bir polisakkarittir. Fakat glikojendeki dallanma daha sıktır ve her 8-10 glukoz biriminde bir ortaya çıkar. Glikojen, α- ve β-amilazların etkisi ile glukoz ve maltoza kadar parçalanır.

Diğer depo polisakkaritleri: Dekstranlar da glikojen ve nişasta gibi, D-glukozun dallanmış polisakkaritleridir. Fakat zincir omurgası $\alpha(1\rightarrow6)$ bağları tarafından oluşturulmaktadır. Maya ve bakteri hücrelerinin depo polisakkaritleridir. Dallanma noktaları, türlere göre farklılıklar gösterir; $1\rightarrow2, 1\rightarrow3$ ve $1\rightarrow4$ olabilir. Dekstranlar son derece viskoz çözeltiler oluştururlar. Fruktan ve levanlar, D-fruktoz birimlerinden meydana gelmiş homopolisakkaritlerdir. Birçok bitkilerde bulunur. Yine bir D-fruktoz polimeri olan ve $\beta(2\rightarrow1)$ bağlarıyla oluşan inuline enginarda rastlanır. Mannan, bakteri, maya ve yüksek bitki hücrelerinde bulunan bir mannoz polisakkariti olup, arabinan da yine bitki dokularında mevcut arabinoz polimeridir.

6.4.b. Yapı Polisakkaritleri

Selüloz: Biosferdeki toplam organik karbonun yarı-

sından fazlası selüloz halindedir. Bitki âlemindeki en basit ve en bol hücre duvarı yapı polisakkaritidir. Odunun yaklaşık yüzde 50'si ve pamuğun tamamı selülozdur.

Selüloz, D-glukoz moleküllerinin hiçbir dallanma olmaksızın, $\beta(1\longrightarrow 4)$ glikozid bağlarıyla oluşturdukları uzun zincir halindeki bir moleküldür. Molekül ağırlıkları 50.000-2.500.000 arasındadır ve bu da 300-15.000 civarında glukoz birimine tekabül etmektedir. X-ışını difraksiyonu ile yapılan analizler, selüloz molekülleri paralel zincirlerinin bir demet halinde düzenlendiklerini ve aralarında çarpraz hidrojen bağları olduğunu göstermiştir. Bunun sonucu olarak meydana gelen fibriller yapı suda çözünmez.

Selülozun $\beta(1\rightarrow 4)$ bağını hidrolizleyebilecek enzimler memelilerin sindirim yolunda olmadığından, bu polisakkaritler sindirilemezler. Fakat geviş getiren hayvanların rumeninde yerleşmiş bakteriler, selülozu D-glukoz birimlerine parçalayabilecek selülaz enzimini salgıladıklarından, bu hayvanlar selülozu besin kaynağı olarak kullanabilirler.

Selüloz, bitki hücre çeperlerinin en önemli bileşenidir. Su bitkilerinin bazı hücreleri, maruz kalabildikleri son derece hipotonik veya hipertonik ortamlara karşı koyabilmek için oldukça sert hücre duvarlarına sahip olmalıdır. Ağaçlarda ise hücre duvarları aynı zamanda çok büyük bir ağırlığı taşıyabilecek bir yapıda bulunmalıdır. Bundan dolayı bitki hücre çeperleri sıkı istiflenmiş selüloz fibrilleriyle sarılıdır. Bu fibriller üç çeşit polimer bileşik tarafından birbirlerine bağlanmış ve yapıştırılmıştır. Bunlar hemiselüloz, pektin ve ekstensindir. Bunlardan en bol bulunanı hemiselülozlardır ve D-ksilozun $\beta(1\longrightarrow 4)$ bağlarıyla oluşturduğu, arabinoz ve diğer şeker yan zincirlerine sahip polisakkaritlerdir. Pektin ise, D-galakturonat ihtiva eden bir polimerdir. Ekstensin ise, pektin ile birleşik bir proteindir ve bol miktarda hidroksiprolin taşıdığından hayvan dokularındaki kollagen

proteinine benzemektedir. Bu yapıdaki bitki hücre çeperleri, çelik çubuklar üzerine betonun döküldüğü bina kolonlarını andırmaktadır ve bu sayede bu çeperler çok büyük streslere karşı koyabilmektedir. Odun lignin adı verilen ve kuru ağırlığının yüzde 25'ini oluşturan bir başka polimerik madde ihtiva etmektedir. Ligninin yapısı tam olarak bilinmemekle beraber bünyesinde polimerleşmiş aromatik alkoller bulunmaktadır.

Kitin: Kitin, böcek ve sürüngenlerin boynuzumsu kabuklarında bulunan ve yalnız N-asetil-D-glukozamin birimlerinden meydana gelmiş bir homopolisakkarittir. Yapı itibariyle selüloza benzerlik gösterir; suda çözünmez ve kristal yapıdaki paralel zincir sıraları oluşturur.

Hiyaluronik asit: İnsan ve hayvan organizmasındaki bağ dokusunun başlıca maddesidir. Birkaç milyon molekül ağırlığında ve kıvamlı bir madde olan hiyaluronik asit, D-glukuronik asit ve N-asetil-D-glukozaminden teşekkül eden bir polisakkarittir. Glikozid bağları $\beta(1\longrightarrow 3)$ ve $\beta(1\longrightarrow 4)$ şeklindedir. Hidrolizlendiği zaman eşdeğer oranda glukuronik asit, glukozamin ve asetik asit verir. Doku ve doku sıvılarında proteinlerle birleşmiş halde bulunur. Hiyaluronik asit, hiyaluronidaz adı verilen bir enzim tarafından hidrolizlenir.

Heparin: Kan pıhtılaşmasını önleyen, karaciğer ve akciğerde teşekkül eden bir polisakkarittir. D-Glukozaminin ve iduronik asidin sülfat esterlerinin bir polimeri olarak kabul edilmektedir. Bütün glikozid bağları $\alpha(1\longrightarrow 4)$ olan heparin organizmada proteinlerle birleşmiş olarak bulunur. Molekül ağırlığı 17.000-20.000 arasında olup, karaciğer ve böbreklerde bulunan heparinaz enzimi tarafından hidroliz edilir.

Kondroitin sülfatlar: İnsan ve memeli hayvan bağ dokusunun ve özellikle kıkırdağın başlıca maddesi olan bu polisakkaritler, proteinlerle birleşmiş olarak bulunurlar. Kondroitin sülfatlar başlıca A,B ve C türlerinde o-

lup, bunlardan A ve C eşdeğer miktarda N-asetil-galaktozamin sülfat ve D-glukuronik asit ihtiva ederler. Her ikisinde de β(1⟶3) ve β(1⟶4) glikozid bağları vardır.

Mukoitin sülfatlar: N-Asetil glukozamin sülfat ve glukuronik asit birimlerini ihtiva eden bir polisakkarittir. Mukoza salgılarında (tükrük, mide özsuyu vb.) proteinlerle birleşmiş halde bulunurlar.

Kan grubu maddeleri: Kan grubu polisakkaritlerinin proteinlerle birleşmesi sonucu meydana gelirler ve eritrosit zarlarında bulunurlar. Genellikle A,B,O (sıfır) ve AB kan grupları adlarını alırlar.

Kan grubu polisakkaritleri umumiyetle D-glukozamin veya D-galaktozamin, bazen her ikisini, bazı monosakkaritleri (D-galaktoz, L-fukoz) ve sialik asit ihtiva ederler.

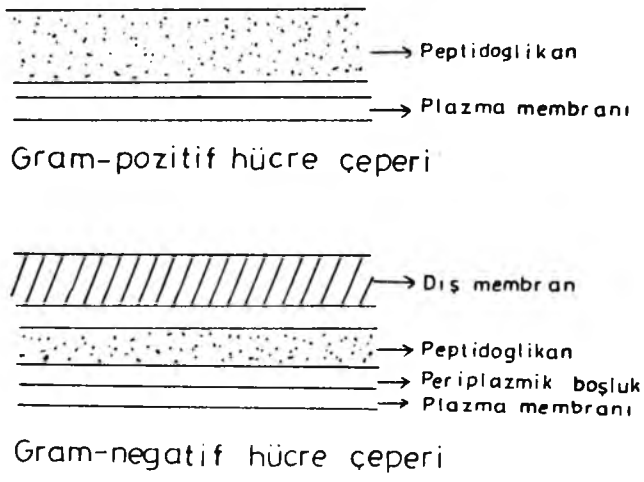
Dokuların başlıca bileşenleri olması dolayısıyla biyolojik bakımdın önemli olan hiyaluronik asit, heparin, kondroitin sülfatlar, mukoitin sülfatlar ve kan grubu polisakkaritlerine mukopolisakkaritler denir. Mukopolisakkaritler genel olarak proteinlerle birleşerek mukoproteinleri veya mukoidleri teşkil ederler. Bunların en büyük kısmı polisakkarit, yaklaşık yüzde 25 kadarı da proteinden ibarettir.

6.5. BAKTERİ HÜCRE ÇEPERLERİ

Bakteri hücreleri, hayvan hücrelerinin aksine, hücre çeperleriyle (hücre duvarı terimiyle aynı manadadır) çevrilmişlerdir. Bu sayede mekanik bir destek ve belirli bir şekil sağlanmış olurlar. Bakterilerde, hücre içi metabolitlerinin yüksek konsantrasyonundan dolayı 20 atmosfere varan bir osmotik basınç oluşur. Hücre membranı bu basınca tek başına karşı koyamaz. Eğer hücer çeperi olmazsa hücre parçalanır.

Bakteriyel hücre çeperlerinin tıbbi önemleri de vardır. Hücre duvarları ve birleşik maddeleri bakterinin virulansından sorumludur. Gerçekten, birçok bakteriyel hastalıkların belirtileri, izole edilmiş bakteri hücre çeperlerinin deney hayvanlarına enjekte edilmesiyle ortaya konulmuştur. Bunun yanısıra, bakterilerin karakteristik antijenleri hücre duvarlarında yerleşmiştir. Hayvanlar, bakteriyel hücre duvarları ekstraktlarının enjeksiyonu sonucu bu bakterilere karşı bağışıklık kazanırlar. Bazı bakteriler hücre duvarlarını sentezlemelerinin inhibe edilmesiyle öldürülebilirler. Penisilin ve diğer bazı antibiyotiklerin etki mekanizmaları bu şekildedir.

Yarım asırdan daha uzun bir süredir bakteriler, gram boyasıyla verdikleri reaksiyona göre, gram-negatif veya gram-pozitif olarak tasnif edilirler. Bu kaba ayırımın altında yatan sebepler bugün anlaşılmıştır. Bu iki sınıf bakteri farklı hücre çeperlerine sahiptir (Şekil. 6.3).

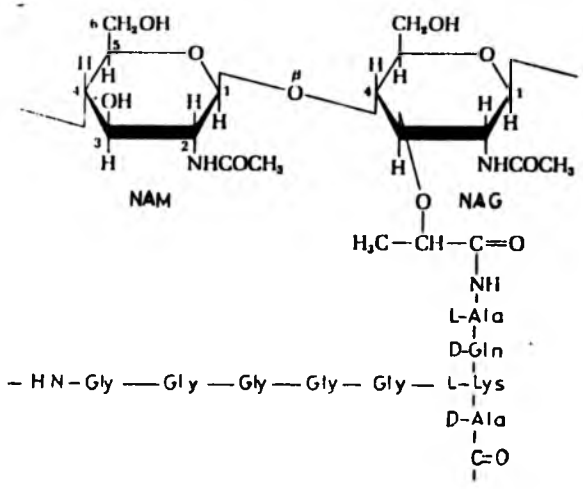


Şekil 6.3. Gram-pozitif ve gram-negatif bakterilerin hücre çeperlerinin şeması.

Gram-pozitif bakterilerin plazma membranları 250 A° kalınlığında kalın bir hücre duvarıyla sarılmıştır. Bu duvar, peptidoglikan ve teikoik asid ile çevrilmiştir. Gram-negatif bakterilerin hücre duvarları daha komplekstir. Bunların plazma membranları 30 A° kalınlığında bir peptidoglikan tabaka ile, bu da 80 A° kalınlığında protein, lipid ve lipoprotein mozaikinden oluşan bir dış membran ile çevrilmiştir.

Gram-pozitif bakterilerin hücre çeperlerini oluşturan peptidoglikan tabakası, peptid ve şeker birimlerinden ibarettir. Lineer polisakkarit zincirleri kısa peptidlerle çarpraz bağlanmıştır. Bu çarpraz bağlanmalar o kadar sıktır ki, sonunda torba şeklinde bir makromolekül ortaya çıkar.

Şekil 6.4'de Staphylococcus aureus bakterisi peptidoglikanını oluşturan başlıca yapıtaşları gösterilmiştir. Burada üç tane tekrarlanan birim vardır: (1)N-Asetil glukozamin (NAG) ve N-asetil müramik asit (NAM)'in β(1⟶4) glikozid bağlarıyla teşkil ettikleri bir disakkarit,

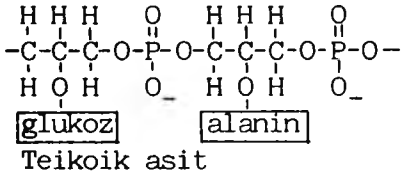


Şekil 6.4. Staphylococcus aureus peptidoglikanının başlıca yapı birimleri.

(2) L-Alanin, D-glutamin, L-lisin ve D-alaninden ibaret bir tetrapeptid ve (3) Bir pentaglisin köprüsü. Tetrapeptidin iki anormal yönü vardır: Birincisi, proteinlerde hiç bulunmayan D-amino asitleri ihtiva ederler. İkinci olarak da, D-glutamin yan grubundaki δ-karboksil üzerinden peptid bağı oluşturur.

Peptidoglikan yapısında NAG ve NAM, lineer bir polisakkarit zinciri teşkil edecek şekilde birbirinin ardısıra sıralanırlar. Pentaglisin, farklı polisakkarit zincirleri üzerindeki NAM birimlerini çarpraz bağlar. Pentaglisinin amino grubu, D-alaninin karboksil grubuyla bir peptid bağı oluştururken, karboksil grubuda lisinin ε-amino grubuyla peptid bağı meydana getirir.

Gram-pozitif bakterilerin yüzeyleri teikoik asid ihtiva ederler. Bu asit, fosfodiester köprüleriyle bağlanmış gliserolün veya ribitol gibi bir diğer şekerin bir polimeridir. Boşta kalan hidroksil grupları alanin veya glukoz gibi şekerlerle ester bağı oluşturmuşlardır. Teikoik asit, peptidoglikanın NAG-NAM omurgasına fosfodiester bağlarıyla bağlanmıştır.

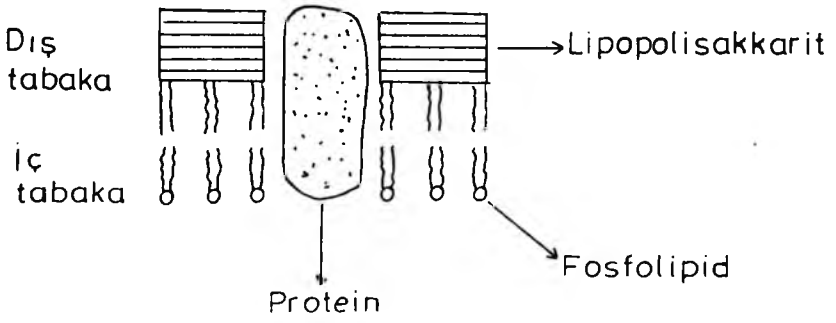


Teikoik asit

Daha önce ifade edildiği gibi, gram-negatif bakteri hücre duvarları, gram-pozitif bakterilere göre daha komplekstir. Gram-negatif hücrelerin peptidoglikan tabakası, fosfolipit, protein ve lipopolisakkaritler ihtiva eden bir dış membranla sarılmıştır. Bu dış membran ileride yapısını göreceğimiz plazma membranı gibi bir ikili tabaka (bilayer) düzenindedir. Gram-negatif bakteriler, peptidoglikan tabakasıyla plazma membranı arasında sıvı ile dolu bir boşluk ihtiva ederler. Bu boşluğa periplazmik boşluk adı verilir. Burada şeker ve diğer besin mad-

delerine bağlanan birçok protein bulunur.

Dış membrandaki lipopolisakkaritler birçok anormal şeker molekülleri ihtiva ederler ve tabakanın dış yüzeyinde yer alırlar. Fosfolipidler ise, alt tabakayı teşkil ederlerken, protein molekülleri ise dış membran boyunca yerleşmişlerdir (Şekil 6.5).



Şekil 6.5. Gram-negatif bakterilerin dış membran yapısı.

7.BÖLÜM: L İ P İ D L E R V E M E M B R A N Y A P I S I

Lipidler, hücrelerde bulunan ve suda çözünmeyen bileşiklerdir. Kloroform, eter ve benzen gibi apolar çözücülerde kolayca çözünürler. Bu grup bileşikler yapı ve fonksiyon bakımından çok büyük farklılıklar arzederler. Lipidlerin başlıca biyolojik fonksiyonları şunlardır: (1) Membranların yapı elemanlarıdır, (2) Metabolik yakıtın hücre içi depolanma şeklidir, (3) Metabolik yakıtın bir taşınma formudur ve (4) Birçok bakterilerin, yüksek bitki yapraklarının, böcek kabuklarının ve omurgalı derilerinin hücre çeperleri için koruyucu bileşenlerdir. Bunların yanısıra yine lipidler grubuna dahil edilen bazı bileşiklerin de vitamin ve hormon olarak etkili bir biyolojik aktiviteleri vardır.

Lipidleri aşağıdaki tarzla sınıflandırmak adet olmuştur:

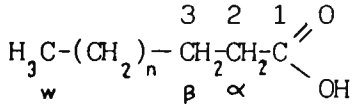
1.Yağ asitleri,
2.Nötral yağlar,
3.Fosfolipidler,
4.Glikolipidler,
5.Mumlar,
6.Steroidler ve terpenler.

Şimdi bunları sırayla inceleyelim.

7.1. YAĞ ASİTLERİ

Yağ asitlerinin birçok hücre ve dokularda serbest haldeki konsantrasyonları çok düşük olmasına rağmen, nötral yağlar, fosfogliseridler, glikolipidler, kolesterol esterleri ve bazı mumların yapı taşları olduklarından bazı özelliklerinin ayrıntılı olarak incelenmesi faydalı olacaktır. Muhtelif hücre ve dokulardan 100'den fazla farklı yağ asitleri izole edilmiştir. Hepsinde uzun bir hidrokarbon zinciri ve bir uç karboksil grubu vardır. Hidrokarbon zinciri doymuş olabilirken, bir veya daha fazla karbon-karbon çift bağı da ihtiva edebilirler. Yağ

asitleri birbirlerinden zincir uzunluğu ve doymamış bağların sayı ve yeri ile ayrılırlar. Sistematik isimlendirilmeleri, hidrokarbon zinciri isminin sonuna "oik" ekinin getirilmesiyle yapılır. Meselâ, C_{18} doymuş yağ asidinin adı oktadekanoik asittir. Çünkü 18 karbonlu hidrokarbon zincirinin adı oktadekandır. Tek çift bağlı C_{18} yağ asidi oktadekenoik, iki çift bağlı oktadekadienoik, üç çift bağlı oktadekatrienoik asit şeklinde isimlendirilirler. 18:0 sembolü doymuş bir C_{18} yağ asidini, 18:2 sembolü ise iki çift bağlı C_{18} yağ asidini gösterir. Yağ asidi karbon atomları karboksil ucundan başlıyarak numaralandırılırlar:



2 ve 3 nolu karbon atomları sırasıyla α ve β sembolleri ile, zincirin en ucundaki metil karbonu ise, w ile gösterilir. Çift bağın yeri Δ sembolünün üzerine yazılan rakamlarla belirtilir. Meselâ cis-Δ^9, 9 ve 10 nolu karbon atomları arasında bir cis-çift bağı, trans-Δ^2 de 2 ve 3 nolu karbonlar arasında bir trans çift bağı olduğunu ifade eder. Yağ asitleri fizyolojik pH'da iyonlaşmış halde bulunduklarından, karboksilik asit yerine karboksilat isimleriyle yazılmaları daha uygundur. Meselâ, palmitik asit yerine palmitat gibi.

Yüksek bitki ve hayvan lipidlerinde bulunan yağ asitleri hakkında bazı genellemelerde bulunulabilir. Hemen hemen hepsi, çift sayıda karbon ihtiva ederlerken zincir uzunlukları 14 ile 22 arasında değişir. Bunların arasında 16 ve 18 karbonlular en bol olanlarıdır. Yağ asitlerinin erime noktaları çift bağ sayısı arttıkça azalır ve zincir uzadıkça da artar (Tablo 7.1). Yüksek organizmalardaki doymamış yağ asitlerinin çoğunda 9 ve 10 nolu karbon atomları arasında bir çift bağ vardır. Birden fazla çift bağ ihtiva eden yağ asitlerinde çift bağlar genelde konjugasyon (-CH=CH-CH=CH- şeklinde) göstermezler, sadece

bazı bitkisel yağ asitlerinde konjugasyon gözlenir. Tabii doymamış yağ asitlerinin çift bağlarındaki geometrik konfigürasyon cis formundadır. Yüksek organizmalarda en bol bulunan doymamış yağ asitleri oleik, linoleik, linolenik ve araşidonik asitlerdir.

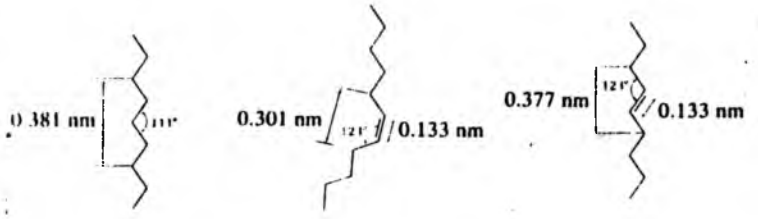
Tablo 7.1. Bazı tabii yağ asitleri.

Karbon No	Genel ismi	Sistematik ismi	Formülü	ErimeNok(°C)
12:0	Laurat	n-Dodekanoat	$CH_3(CH_2)_{10}COO^-$	44,2
14:0	Miristat	n-Tetradekanoat	$CH_3(CH_2)_{12}COO^-$	53,9
16:0	Palmitat	n-Hekzadekanoat	$CH_3(CH_2)_{14}COO^-$	63,1
18:0	Stearat	n-Oktadekanoat	$CH_3(CH_2)_{16}COO^-$	69,6
20:0	Araşidat	n-Eikosanoat	$CH_3(CH_2)_{18}COO^-$	76,5
24:0	Lignoserat	n-Tetrakosanoat	$CH_3(CH_2)_{22}COO^-$	86,0
16:1	Palmitoleat	cis-Δ^9-Hekzadeke-noat	$CH_3(CH_2)_5CH{=}CH(CH_2)_7COO^-$	-0,5
18:1	Oleat	cis-Δ^9-Oktadeke-noat	$CH_3(CH_2)_7CH{=}CH(CH_2)_7COO^-$	13,4
18:2	Linoleat	cis,cis-Δ^9,Δ^{12} Oktadekadienoat	$CH_3(CH_2)_4(CH{=}CHCH_2)_2(CH_2)_6COO^-$	-5
18:3	Linolenat	hep cis-$\Delta^9,\Delta^{12},\Delta^{15}$ Oktadekatrienoat	$CH_3CH_2(CH{=}CHCH_2)_3(CH_2)_6COO^-$	-11
20:4	Araşidonat	hep cis-$\Delta^5,\Delta^8,\Delta^{11},\Delta^{14}$-Eikosatetraenoat	$CH_3(CH_2)_4(CH{=}CHCH_2)_4(CH_2)_2COO^-$	-49,5

Bakteri lipidleri yüksek organizmalara nazaran daha az sayıda ve daha basittir. Meselâ, E.coli lipidlerinde C_{12}-C_{18} arasında doymuş, C_{16} ve C_{18} tek çift bağa sahip doymamış yağ asitleri vardır. Birden fazla çift bağ taşıyan yağ asitlerine bakterilerde rastlanmaz.

Doymuş ve doymamış yağ asitleri yapısal konformasyon yönünden birbirlerinden önemli derecede farklılıklar gösterir. Doymuş yağ asitlerinde hidrokarbon zinciri sonsuz sayıda konformasyona sahip olabilir, çünkü omurgadaki herbir tekli bağın tam dönme serbestisi vardır. Bunların en az enerjili ve en muhtemel konformasyonu Şekil 7.1'de

gösterilen uzanmış halidir. Doymamış yağ asitlerinde de dönme serbestisi olmayan çift bağda,eğer cis ise, 30°'-lik bir bükülme vardır (Şekil 7.1). Trans şekli ise, aynen doymuş yağ asitlerinkine benzer. Cis şekilleri, trans şekillere göre daha az kararlıdır ve biri diğerine bazı katalizörlerle çevrilebilmektedir. Birden fazla çift bağ ihtiva eden yağ asitlerindeki cis konfigürasyonu, bükülmelerden dolayı hidrokarbon zincirini kısaltır. Doymamış yağ asitlerinin böyle konfigürasyonlarının özellikle membranlarda biyolojik önemi vardır.



(a) (b) (c)

Şekil 7.1. Doymuş ve doymamış yağ asitlerinin konfigürasyonu. **(a)** Doymuş, **(b)** Cis-çift bağ, **(c)**Trans-çift bağ.

Uzun zincirli yağ asitleri suda çözünmezler. Bunların sabun adı verilen Na^+ ve K^+ tuzları, su içinde hidrofobik etkileşmelerle de stabilize edilen miseller oluştururlar.

Doymuş ve doymamış tabii yağ asitleri görünür ve yakın ultraviyole bölgede absorbsiyon göstermezler. Bununla beraber birden fazla çift bağa sahip yağ asitleri, KOH ile ısıtıldıkları zaman konjuge çift bağları olan izomerlerine çevrilirler. Konjuge bağların 230 ile 260 nm arasında karakteristik absorbsiyonları olduğundan, birden fazla çift bağ ihtiva eden yağ asitlerinin izomerleştirdikten sonra spektrofotometrik olarak kantitatif tayinini yapmak mümkündür.

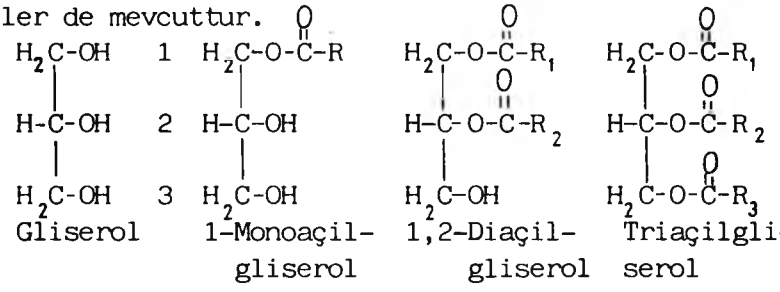
Doymamış yağ asitleri çift bağlarında katılma reak-

siyonlarına maruz kalabilirler. Meselâ Cl_2 veya I_2 gibi halojenler, çift bağlara kolayca katılabilir. Bundan faydalanarak halojenlerle yapılan kantitatif titrasyonla, yağ asidi veya lipid nümunelerindeki çift bağ sayıları hakkında bilgi edinilebilir.

Memeliler, doymuş yağ asitleri ile tek çift bağlı doymamış yağ asitleri sentez edebilirler. Çünkü bu yaratıklarda, yağ asidi zincirlerinin 9 nolu karbonundan daha sonraki karbon atomlarında çift bağ oluşturacak enzimler yoktur. Bunun sonucu olarak linoleat (18:2 cis-Δ^{9}, Δ^{12}) ve linolenat (18:3 cis-$\Delta^{9}, \Delta^{12}, \Delta^{15}$) yağ asitleri sentezlenemez. Her iki yağ asidine esensiyal yağ asitleri adı verilir. Esensiyal terimi bunların organizma tarafından sentezlenemediği ve diyetle alınması gerektiği manasına gelmektedir. Diyetle alınan linoleat ve linolenat, birçok diğer doymamış yağ asitlerinin sentezlendiği ön madde görevini yaparlar. Memelilerdeki doymamış yağ asitleri palmitoleat, oleat, linoleat veya linolenattan türetilir.

7.2. NÖTRAL YAĞLAR

Açilgliseroller veya gliseridler olarak ta bilinen bu bileşikler, yağ asitlerinin gliserolle meydana getirdikleri esterlerdir. Hayvan ve bitki hücrelerindeki yağ depolarının (özellikle hayvanlardaki adipoz dokunun) başlıca bileşenleridir. Gliserolün üç hidroksil grubunun yağ asitleriyle esterleştiği bileşikler triaçilgliseroller olarak bilinir. Trigliseridler adı da verilen bu lipidler, tabiatta nötral yağların büyük bir kısmını oluştururlar. Bunun yanısıra diaçilgliseroller ve monoaçilgliseroller de mevcuttur.



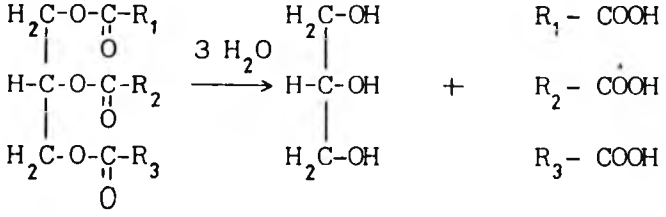
Gliserol — 1-Monoaçil-gliserol — 1,2-Diaçil-gliserol — Triaçilgliserol

Triaçilgliserollerdeki yağ asitlerinin hepsi de aynı ise (yani $R_1 = R_2 = R_3$ ise), bunlara basit, eğer birbirinden farklı ise (yani $R_1 \neq R_2 \neq R_3$ ise) bunlara da karışık triaçilgliseroller adı verilir. İsimlendirilmeleri ise yağ asitlerine ve esterleştikleri gliserol karbon numarasına göre yapılır. Meselâ, tristearin (basit), tripalmitin (basit), 2-stearoildipalmitoilgliserol (karışık) ve 1-palmitoil-2-stearoil-3-lauroil gliserol (karışık).

Nötral yağların erime noktaları ihtiva ettikleri yağ asitlerinin cinsine bağlıdır. Yani yağ asitlerinin doymamışlık sayısı ile azalırken, zincir uzunluğuyla artar. Meselâ, tristearin ve tripalmitin 20°C'da katı iken triolein ve trilinolein sıvıdır. Bütün triaçilgliseroller suda nisbeten çözünmezler ve kendi kendilerine çok dispers miseller teşkil etme eğilimleri de yoktur. Bununla beraber diaçil ve monoaçil gliseroller polarlıkları ve serbest hidroksil grupları yüzünden kolayca misel oluştururlar. Nötral yağlar eter, kloroform, benzen ve sıcak etanolde çözünürler. Sudan daha hafiftirler.

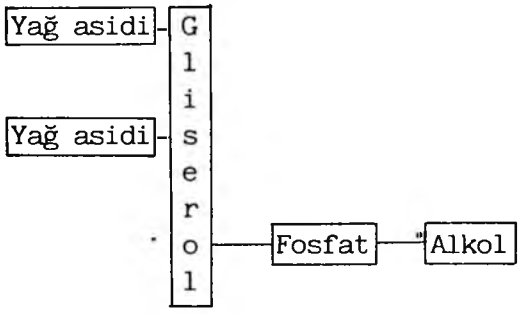
Gliserolün kendisi optikçe aktif olmamasına rağmen, 1 ve 3 nolu karbon atomları üzerindeki yağ asitleri farklı olduğu zaman 2 nolu karbon asimetrik olur. Tabiatta bulunan asimetrik karbonlu triaçil gliserollerin L-gliseraldehide benzer konfigürasyona sahip olduğu gösterilmiştir.

Gliseridler, asit ve bazlarla kaynatıldıkları zaman veya lipaz adı verilen ve pankreas salgısında bulunan enzimler etkisiyle hidrolizlenirler. Alkalilerle hidrolizine sabunlaşma adı verilir ve yağ asidi sabunlarıyla gliserol karışımı meydana gelir. Hidroliz reaksiyonunu şöyle gösterebiliriz:



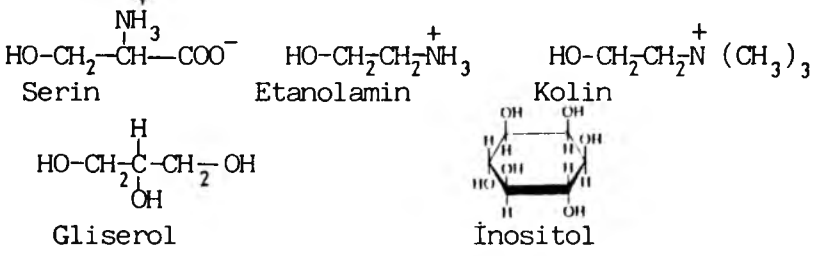
7.3. FOSFOLİPİDLER

Fosfolipidler, biyolojik membranların en önemli bileşenleridir. Daha önce görülen gliserol alkolünün ve daha kompleks bir alkol olan sfingozinin türevleridir. Gliserolden türetilen fosfolipidlere fosfogliseridler adı verilir. Bir fosfogliserid, bir gliserol omurgası, iki yağ asidi ve fosforilleşmiş bir alkolden ibarettir.

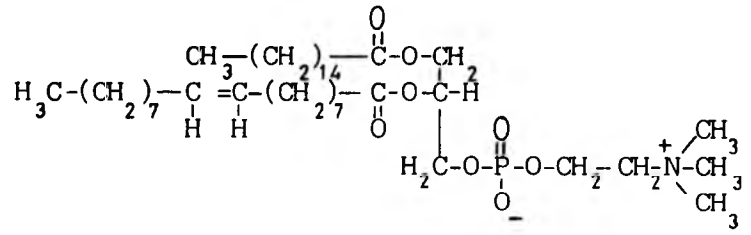


Fosfogliseridlerde gliserolün 1 ve 2 nolu karbonlarındaki hidroksil grubu, iki yağ asidinin karboksil gruplarıyla, 3 nolu karbon hidroksili de fosforik asitle esterleşmiştir. Oluşan bileşiğe fosfatidat adı verilir ve en basit fosfogliseriddir. Membranlarda çok az miktarda fosfatidat bulunur. Bununla beraber fosfatidatlar diğer fosfogliseridlerin biyosentezinde önemli bir ara bileşiktir.

Fosfogliseridler, fosatidatlardaki fosfat grubunun bir takım alkollerin hidroksil grubuyla esterleşmesi sonucu ortaya çıkar. Bu alkoller serin, etanolamin, kolin, gliserol ve inositoldur. Bunların açık formülleri aşağıdadır:

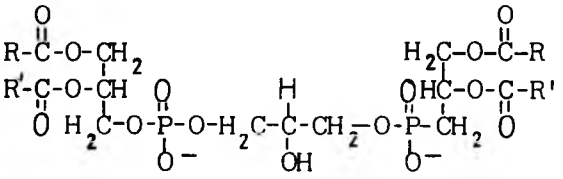


Şimdide fosfogliseridlere örnek olarak yüksek organizmaların membranlarında çok bulunan bir fosfatidil kolinin yapısını verelim:



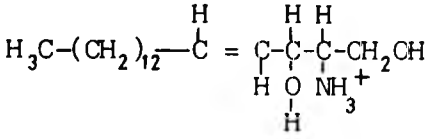
1-Palmitoil-2-oleoil-fosfatidil kolin

Gliserol, 1 ve 3 nolu karbonları üzerindeki iki hidroksil grubunun esterleşmesi sebebiyle difosfatidil gliserolleri meydana getirir.

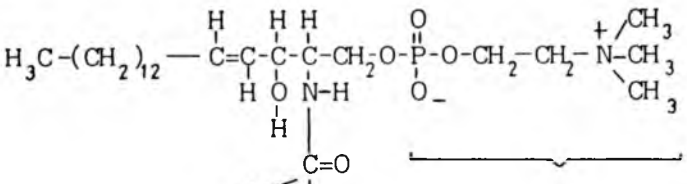


Disfosfatidil gliserol

Sfingomiyelin, membranlarda bulunan ve gliserolden türetilmeyen tek fosfolipiddir. Sfingomiyelin omurgasını, uzun ve doymamış bir hidrokarbon zinciri ihtiva eden bir amino alkol olan sfingozin teşkil eder. Sfingomiyelinde, sfingozinin amino grubu bir yağ asidine amid bağıyla bağlanırken, primer hidroksil grubu da fosforil kolin ile esterleşir. Sfingomiyelinin konformasyonu fosfatidil koline çok benzer.



Sfingozin



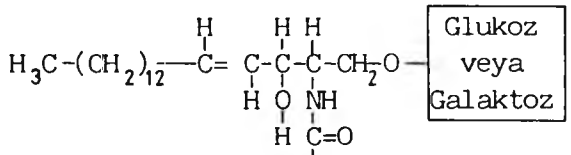
Yağ asidi birimi

Fosforilkolin birimi

Sfingomiyelin

7.4. GLİKOLİPİDLER

İsminden de anlaşıldığı gibi glikolipidler, şeker ihtiva eden lipidlerdir. Glikolipidler de sfingomiyelin gibi sfingozin alkolünden türemiştir. Sfingozin omurgasının amino grubu sfingomiyelinde olduğu gibi bir yağ asidiyle amid bağı yapmıştır. Primer hidroksil grubu ise, fosforilli kolin yerine bir veya daha fazla sayıda monosakkarit ile birleşmiş haldedir. En basit glikolipidler, yalnız bir tek glukoz veya galaktoz molekülü ile bağlanmış bileşiklerdir ve bunlara serebrosit adı verilir. Şeker bağlanmamış, yalnız yağ asidiyle açillenmiş haline de seramid adı verilir. Aşağıda bir serebrosit molekülünün genel formülü verilmiştir:



Yağ asidi birimi

Şeker birimi

Bir serebrosit

Yukarıda görülen serebrosit molekülündeki şeker biriminin yerine yedi adet monosakkarit molekülü kadar bir oligosakkarit grubunun yer aldığı glikolipidler de vardır. Bunlara gangliositler adı verilir. Gangliositler özellikle sinir hücre membranlarının dış yüzeyinde bulu-

nurlar. Sığır beyni gangliositlerinin hidrolizi sonucu yağ asidi, sfingozin alkolü, D-glukoz ve D-galaktoz monosakkaritleri ile N-asetil galaktozamin ve N-asetil nöraminik asit amino şekerleri elde edilmiştir. Yapı itibariyle serebrositlere benzeyen gangliositlerde, tek bir şeker birimi yerine kompleks bir oligosakkarit bulunmaktadır.

7.5. MUMLAR

Mumlar, yüksek yağ asitleri ile uzun zincirli monohidroksilik alkollerin yapmış oldukları esterlerdir. Bu bileşikler deri, kürk ve tüylerin koruyucu örtüsünü teşkil ederken, yüksek bitkilerin meyve ve yapraklarının ve birçok böceğin kutikillerinin dış yüzeylerinde yer alırlar. Balmumunun başlıca bileşenleri, uzun zincirli alkollerle palmitik asidin yapmış olduğu esterlerdir. Yaprak mumları ise, 26 ile 34 karbon atomlu alkollerle yağ asitlerinin ester bağı ile birleşmesi sonucu oluşmuştur.

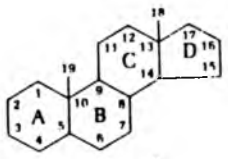
7.6. STEROİDLER VE TERPENLER

Buraya kadar anlattığımız lipidler, alkalilerle ısıtıldığı zaman, yağ asitlerinin sabunlarını meydana getirdiklerinden bunlara sabunlaşabilen lipidler adı verilir. Çok düşük nisbette olsa da, hücrelerde sıcak alkali ortamda hidroliz sonucu sabun oluşturmayan lipidler de vardır. Bunlar başlıca iki çeşittir: steroidler ve terpenler. Steroidler ve terpenler iki farklı bileşik sınıfını teşkil etmelerine rağmen, beş karbonlu müşterek yapı taşlarının türevleri olmaları bu iki bileşiğin yakınlığını oluşturmaktadır.

7.6.a. Steroidler

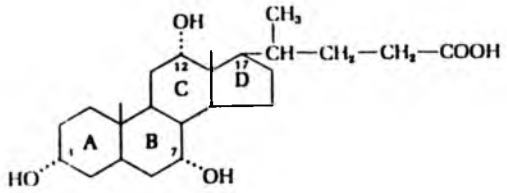
Üç siklohekzan halkasının fenantren düzeninde kondansasyonu sonucu teşekkül eden siklopentanoperhidrofenantren türevidirler. Tabii steroidler içinde en önemli-

leri safra asitleri, cinsiyet ve adrenal korteks hormonları ile sterollerdir.



Siklopentanoperhidrofenantren halkası

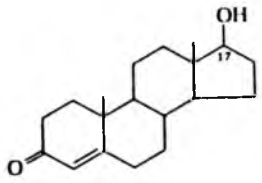
Safra asitleri içinde, insan safrasında en bol bulunanları kolik asit, dezoksikolik asit ve kemodezoksikolik asittir.



Kolik asit

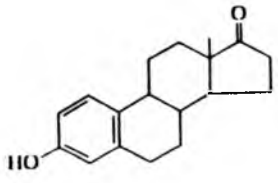
Safra asitleri glisin ve taurine bağlı olarak salgılanırlar ve suda kolayca çözünebildikleri gibi, diğer lipidleri emülsiyon haline getirerek ince bağırsaklarda sindirilmelerini kolaylaştırırlar.

Erkek ve dişi cinsiyet hormonlarının her ikisi de steroid yapısındadır. Bunlardan erkek cinsiyet hormonu olan testosteron testiste sentezlenir.

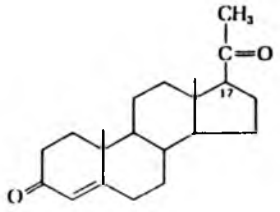


Testosteron

İki tip dişi cinsiyet hormonu vardır: östrojenler ve progesteron. Üç çeşit östrojen hormonu tesbit edilmiştir: östron, östradiol ve östriol. Bunların üçü de yumurtalıkta sentezlenir ve A halkaları fenolik özelliktedir. Progesteron ise gebelik esnasında corpus luteumda sentezlenir ve 17. karbon pozisyonunda bir yan zincire sahiptir.

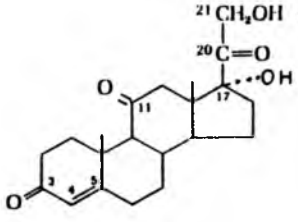


Östron

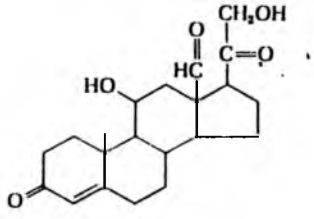


Progesteron

Adrenal korteksten hormon aktivitesine sahip birçok steroidler izole edilmiştir. Bunlar etkilerine göre iki sınıfa ayrılmışlardır: (1) Karbohidrat metabolizması üzerinde, (2) Mineral metabolizması üzerinde tesirli olanlar. (1) Nolu sınıfa kortizon ve kortizol, (2) nolu sınıfa da aldosteron örnek verilebilir.

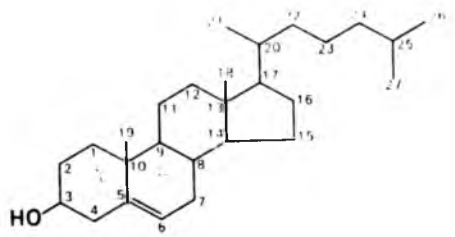


Kortizon



Aldosteron

Buraya kadar saydığımız steroidler canlılarda çok az miktarda bulunurlar. Fakat steroidlerden bir grup vardır ki, oldukça bol miktarda rastlanır. Steroller adı verilen bu bileşiklerde 3 nolu karbonda bir alkolik hidroksil grubu ve 17 nolu karbonda ise, 8 veya daha fazla sayıda karbondan ibaret dallanmış bir alifatik zincir vardır. Steroller ya serbest alkoller veya C-3 hidroksil grubunun uzun zincirli yağ asitleriyle oluşturduğu esterler halinde bulunurlar. Kolesterol hayvan dokularında hem serbest hem de birleşik halde en bol olarak bulunan steroldür. Hayvan hücre membranlarında çok, mitokondri ve endoplazmik retikulum membranlarında ise az miktarlarda kolestrol mevcuttur. Yün yağında bulunan lanosterol ise, kolesterol biyosentezinde önemli bir ara bileşiktir. Bitki hücrelerinde kolesterol yoktur ve fitosteroller adı verilen bir grup sterolleri bünyelerinde bulundururlar. Bakterilerde steroller mevcut değildir.

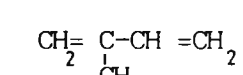


Kolesterol

7.6.b. Terpenler

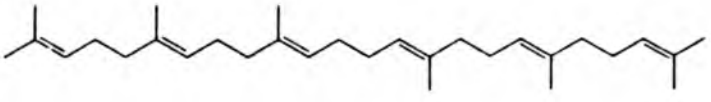
Hücrelerin çok az miktarda ihtiva ettikleri ve 5 karbonlu bir hidrokarbon olan izopren (2-metil-1, 3-butadien) yapıtaşlarından ibaret bileşiklerdir. 2 izopren birimi ihtiva eden terpenlere monoterpenler, 3,4,6 ve 8 izopren ihtiva eden terpenlere de sırasıyla seskuiterpenler, diterpenler, triterpenler ve tetraterpenler adı verilir. Terpenler lineer veya siklik olabilir. Bazıları lineer ve siklik yapıların ikisini de ihtiva edebilirler.

Bitkilerde dört veya daha fazla izopren birimi ihtiva eden reçine asitleri de bulunur. Kauçuk ta izoprenin bir polimerizasyon ürünüdür. Klorofilde porfirin halkasıyla birleşmiş olarak yer alan fitol, dört izopren biriminin yanısıra son karbon atomunda bir de primer alkol grubu ihtiva eder. Altı izopren birimi taşıyan skualen ise, hayvan organizmasında husule gelen bir terpen



İzopren

olup, kolesterolün biyosentezinde bir ara bileşik vazifesi görür. Steroidlerle terpenlerin yakınlığı buradan hasıl olur.



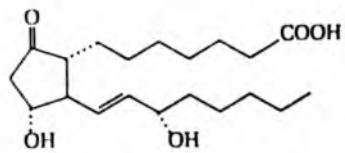
Skualen

Sekiz izopren birimi ihtiva eden terpenlere karoten adı verilir. A-vitamini bir karoten türevidir. Birçok tabii yağların sarı renklerini veren, karoten yapısındaki bileşiklerdir.

7.7. PROSTAGLANDİNLER

İlk defa 1930'larda koyunların ve diğer memelilerin prostatlarında bulunduğundan bu ismi alan prostaglandinler, son yıllarda üzerinde çok sayıda araştırma yapılan bileşiklerdir. Prostaglandinler beş karbonlu bir halka ihtiva eden yirmi karbonlu yağ asitleridir. Başlıca sı-

nıfları PGA,PGB,PGE ve PGF ile gösterilir. Bunlardan yağ dokusu üzerindeki etkileri ayrıntılı şekilde incelenmiş olan prostaglandin PGE_1'in açık formülü aşağıdadır:



PGE_1

Prostaglandinler, kendileri hormon olmadıkları halde hormonların aktivitelerini etkilerler. Genellikle sentezlendikleri hücrelerin aktivitelerini değiştirirler. Etki tarzları hücreden hücreye farklılıklar gösterir. Prostaglandinlerin başlıca tesirlerinin moleküler seviyede izahları henüz yapılamamıştır. Tesbit edilen bazı etkileri şunlardır: Enflamasyonu stimüle eder, belirli organlara kan akışını düzenler, bazı membranlardan iyon geçişini kontrol eder ve sinaptik iletimi değiştirir.

Prostaglandinler membranlarda 20 karbonlu ve en az üç çift bağ ihtiva eden yağ asitlerinden sentezlenir. Bu yağ asitleri vücutta sentezlenemediğinden diyetle alınmaları gerekir.

7.8. BİYOLOJİK MEMBRANLARIN YAPISI

Biyolojik membranlar protein ve lipidlerden ibaret organize topluluklardır. Membranların yürüttüğü fonksiyonlar canlılığın varlığı ve devamı için hayati öneme haizdir. Bunlar sayesinde hücreler münferit birimler halinde çevreden ayrılırlar. Membranlar spesifik moleküler pompa ve kapılar yardımıyla son derece seçici geçirgenlik engelleridir. Böylece hücre içi iyonik ve moleküler terkip düzenlenmiş olur. Ökaryotik hücreler, mitokondriler,

kloroplastlar ve lizozomlar gibi organelleri sınırlayan hücre içi membranlara da sahiptirler.

Membranlar aynı zamanda hücreler ve kendi çevreleri arasındaki bilgi akışını da kontrol ederler. Dıştan gelecek uyarıları algılayacak reseptörler taşırlar. Meselâ bakterilerin gıdalarına doğru hareketleri, hedef hücrelerin insülin gibi hormonlara cevabı ve ışığın algılanması proseslerinde ilk olay, sinyalin membrandaki spesifik bir reseptör tarafından tesbit edilmesidir. Bundan başka bazı membranlar kimyasal veya elektriksel sinyaller üretirler. Sonuç olarak membranlar biyolojik haberleşmede önemli rol oynarlar.

Biyolojik sistemlerde bulunan iki önemli enerji dönüşüm prosesi, son derece düzenle dizilmiş protein ve enzimleri ihtiva eden membran sistemleri tarafından yürütülür. Bunlardan kloroplastların iç membranında vuku bulan fotosentez olayında ışık enerjisi kimyasal bağ enerjisine dönüştürülürken, mitokondrilerin iç membranında da besin maddelerinin oksidasyonu sonucu oksidatif fosforilasyon adı verilen bir olayla ATP (adenozin trifosfat) sentezlenir.

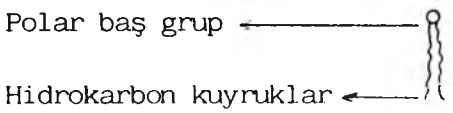
Membran lipidleri: Lipidlerden fosfogliseridler, glikolipidler, sfingomiyelin ve kolesterol membran yapısında bulunur. Bu dört grup lipid birbirlerinden farklı olmasına rağmen çok önemli müşterek bir özelliğe sahiptirler. Bu da molekül yapılarında bir hidrofilik ve bir de hidrofobik kısmın olmasıdır. Membran lipidlerinde bu kısımları oluşturan birimler Tablo 7.2'de gösterilmiştir.

Bir fosfogliserid molekülünün,meselâ fosfatidil kolinin, en kararlı konformasyonunu incelediğimiz zaman yaklaşık dikdörtgen şeklinde olduğunu görürüz. İki yağ asidi zinciri birbirine hemen hemen paralel iken, fosforil kolin kısmı da ters istikamette yer alır. Sfingomiyelinin de benzer bir konformasyona sahip olduğu görülür. Bir glikolipidin şeker grubu, sfingomiyelinde bulunan fosfo-

ril kolinle yaklaşık aynı pozisyonda yer alır. Fosfolipid ve glikolipid molekül konformasyonlarının bu derece benzerliklerinden hareket ile bu moleküllerin hidrofilik polar baş grubu bir daire, hidrofobik hidrokarbon zincirleri ise dalgalı çizgiler halinde göstermek mümkündür.

Tablo 7.2. Membran lipidlerinin hidrofobik ve hidrofilik birimleri.

Membran lipidi	Hidrofobik birim	Hidrofilik birim
1.Fosfogliseridler	Yağ asidi zincirleri	Fosforil alkol
2.Sfingomiyelin	Yağ asidi ve sfingozin hidrokarbon zincirleri	Fosforil kolin
3.Glikolipid	Yağ asidi ve sfingozin hidrokarbon zincirleri	Bir veya daha fazla şeker birimi
4.Kolesterol	OH-grubunun dışında molekülün tümü	3 nolu karbon üzerindeki OH



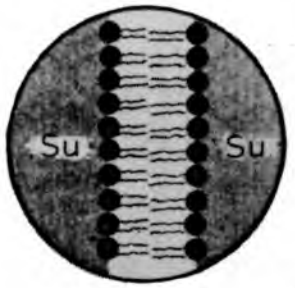
Bir fosfolipid veya glikolipid molekülünün sembolü

Şimdi sulu ortamda fosfolipid ve glikolipidlerin düzenlenmelerini ele alalım. Polar baş gruplarının suya afinitesi olduğu ve hidrokarbon kuyruklar da sudan kaçtığı için miseller hasıl olur. Miseller polar baş grupların yüzeyde, hidrofobik kuyrukların iç kısmında yer aldığı küresel yapılardır.

Bu membran lipidlerinin hem hidrofobik, hem de hidrofilik eğilimlerini tatmin edebilecek bir diğer düzenleme de bimoleküler tabaka veya lipid ikili tabakası adı verilen yapıdır. Bu yapı, sulu ortamda fosfolipid ve glikolipidlerin misellere göre daha düşük enerjili olduğu ve bu yüzden tercih ettikleri yapıdır. Bunun biyolojik önemi

son derece çoktur. Çünkü bir miselin büyüklüğü en fazla 200 A°'luk bir çap ile sınırlanmıştır. Fakat bir bimoleküler tabakada ise, milimetreye (10^7 A°) varan makroskobik boyutlar elde edilebilir. Glikolipidler ve fosfolipidler kolayca bimoleküler tabaka oluşturduklarından, membranların vaz geçilmez bileşenleridirler. Bu tabakalar akışkan olmalarına rağmen geçirgenlik engeli vazifesini de görürler. Aşağıda fosfolipidlere ait bir miselin ve bir bimoleküler tabakanını kesiti verilmiştir.

Misel



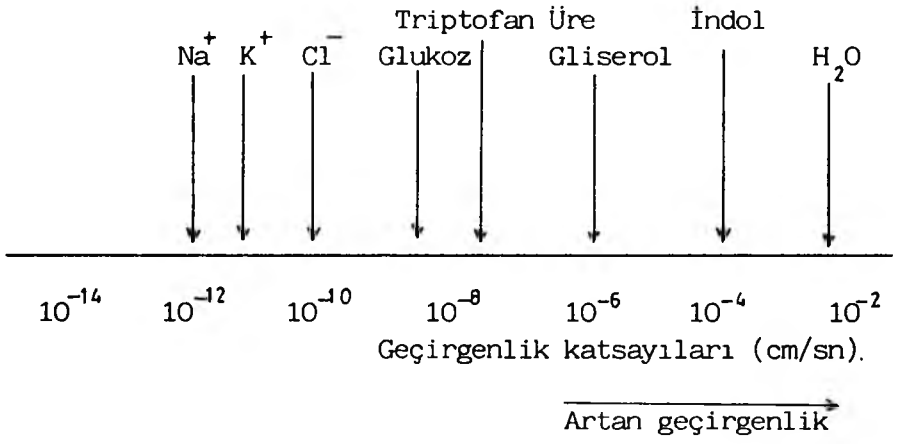
Bimoleküler membran tabakası

Lipid ikili tabakalarının teşekkülü kendiliğinden vuku bulan bir biraya gelme olayıdır. Diğer bir deyişle bu yapı lipid moleküllerinin hidrofilik ve hidrofobik özelliklerinin ortaya çıkardığı tabii neticedir. Lipid ikili tabakalarının teşekkülü için en başta gelen faktör hidrofobik etkileşmelerdir. Bu etkileşmelerin proteinlerin katlanmasında da önemli rolleri olduğunu görmüştük. Membran lipidlerinin hidrokarbon kuyrukları ikili tabakanın apolar iç kısmında sıralandığından su molekülleri buradan uzaklaştırılır. Bunun sonucu olarak entropi büyük

ölçüde artar. Bundan başka hidrokarbon kuyrukları arasında Wan der Waals çekim kuvvetleri de vardır. Bu kuvvetler hidrokarbon zincirlerinin daha sık istiflenmesini sağlar. Polar baş grupları ile su molekülleri arasındaki iyonik ve hidrojen bağı etkileşmeleri de lipid ikili tabaka yapısını daha kararlı hale getiren faktörlerdendir.

Lipid membranlarını stabilize eden yukarıdaki âmiller biyolojik yönden önemli şu neticeleri verir: (1) Lipid ikili tabakalarının uzamaya tabii eğilimleri vardır, (2) Lipid ikili tabakaları, hidrokarbon zincirlerini sulu ortamdan uzaklaştırmak için birbirleri üzerine kapanma eğilimine sahiptir ve bunun sonucu olarak kapalı bölümler oluşur, (3) Lipid ikili tabakalarındaki bir delik enerji yönünden uygun olamayacağından kendisini tabii olarak tamir eder.

Lipid ikili tabakaları iyon ve birçok polar bileşikler için geçirgen bir ortam değildir. Bu membran yapılarının geçirgenliği birtakım suni lipid vezikülleri (torbacıkları) ile yapılan deneylerle incelenmiştir. Bu incelemeler sonucu yukarıda da belirttiğimiz gibi, lipid ikili tabaka membranlarının iyonlar ve polar bileşikler karşısında az geçirgen olduğu bulunmuştur. Fakat su, bu genelleştirmenin sürpriz bir istisnasıdır. Ölçülen geçirgenlik katsayıları çok geniş bir aralıkta yer almaktadır (Şekil 7.2). Meselâ Na^+ ve K^+ iyonları bu membranları suya göre 10^9 defa daha yavaş geçerler. pH 7'de zwitter iyon halinde olan triptofan, kendisine yapıca benzeyen fakat iyonik grupları taşımayan indole nazaran 10^3 defa daha yavaş olarak membranı geçer. Küçük moleküllerin geçirgenlik katsayıları, onların apolar çözücülerdeki çözünürlükleriyle doğru orantılıdır. Bu münasebet, küçük bir molekülün lipid ikili membranından şu şekilde geçebileceğini anlatmaktadır; önce çevresindeki "su çözünme tabakasını" dağıtır, daha sonra membranın hidrokarbon bölümünde çözünür ve sonunda bu bölümün içinden difüze olarak membranın öbür tarafına geçer ve orada su tarafında tekrar çözünür.



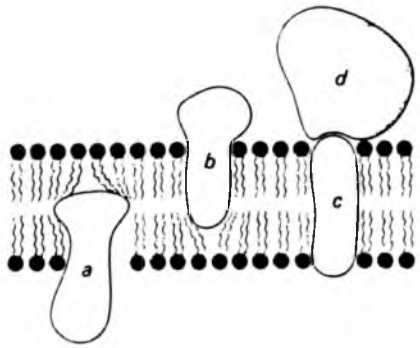
Şekil 7.2. Bazı iyon ve moleküllerin lipid ikili tabaka membranlarındaki geçirgenlik katsayıları.

Membran proteinleri: Membranlar tarafından yürütülen dinamik proseslerden membran proteinleri sorumludur. Membran lipidleri bir geçirgenlik barajı ve hücre ile hücre içi kompartımanlarını oluştururken, bazı spesifik proteinler de transport, haberleşme ve enerji dönüşümü gibi membran fonksiyonlarını görürler. Membran lipidleri aynı zamanda bu proteinlerin vazifelerini en verimli şekilde yapabilmeleri için uygun bir ortam oluştururlar.

Membranların protein muhtevaları farklı farklıdır. Meselâ bazı sinir liflerinin etrafında yalıtkanlık görevi yapan miyelin kılıfında protein oranı düşüktür (%18). Çünkü bu iş için lipidler daha uygundur. Bunun yanısıra hücrelerin plazma membranları daha aktiftir ve birçok pompalar, geçitler, reseptörler ve enzimler ihtiva ederler. Plazma membranlarının % 50'si proteindir. Enerji dönüşümünün gerçekleştiği mitokondri ve kloroplast iç membranları ise, % 75 civarında protein ihtiva ederler. Sonuç olarak farklı fonksiyon gören membranların protein

miktar ve çeşitleri de farklıdır.

Bazı membran proteinleri, iyonik şiddeti yüksek çözeltilerle (meselâ 1M NaCl ile) kolayca serbest hale geçirilebildiği halde bazılarını da membran yapısından ayırabilmek için deterjan veya organik çözücü kullanılır. Membrandan ayrışma farklılığına göre membran proteinleri periferik ve integral olmak üzere ikiye ayrılır. İntegral proteinler, membran lipidlerinin hidrokarbon zincirleriyle büyük miktarda etkileştiği için, bunları membrandan ayrıştırmak, bu apolar etkileşmeleri deterjan veya organik solventlerle yenmek suretiyle mümkün olur. Periferik proteinler ise, membranlara elektrostatik ve hidrojen bağı etkileşmeleriyle bağlandığından bu polar etkileşmeler tuz ilâvesi veya pH değişikliği ile ortadan kaldırılabilir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar periferik membran proteinlerinin, integral protein yüzeylerine bağlandıklarını göstermiştir (Şekil 7.3).



Şekil 7.3. Membran proteinleri: a,b,c integral protein; d, periferik protein.

Şekil 7.3'te de görüldüğü gibi integral proteinlerin bazıları lipid ikili membran tabakayı boydan boya geçerken, bazıları membranın yalnız bir tek yüzeyinden dışarıya bakmaktadır. Yapılan çalışmalar, periferik proteinlerin yalnızca membranların sitoplazma yüzeyine yapışmış olduğunu göstermiştir. Aynı zamanda glikoprotein ve

* Yalnızca yerine her iki tarafında olacak

glikolipidlerin şeker birimleri de her zaman plazma membranlarının dış yüzeyinde yer alırlar. Hücre yüzeylerindeki karbohidratların hücrelerin birbirini tanımasında önemli rolleri vardır. Hem integral ve periferik proteinlerin membrandaki yerleşimleri, hem de glikolipid ve glikoproteinlerin şeker karışımlarının dış kısma bakmaları, plazma membranlarının iç ve dış yüzeylerinin asimetrik olduğunu göstermektedir.

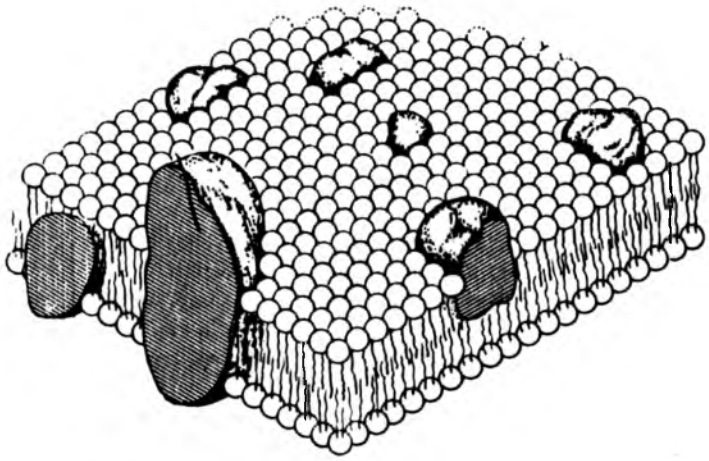
Biyolojik membranların akışkan-mozaik modeli: Son yıllarda yapılan çalışmalar, biyolojik membranların statik ve rijid bir yapıya sahip olmadıklarını ortaya çıkarmıştır. Membran lipid ve proteinlerinin, membran düzleminde hızla difüze oldukları gösterilmiştir. Meselâ bir membran proteini yaklaşık bir dakikada birkaç mikron yol alırken, bir lipid molekülü bir bakterinin bir ucundan diğer ucuna bir saniyede varabilmektedir. Membran protein ve lipidlerinin bu difüzyon özelliklerinden faydalanarak 1972 yılında S.Jonathan Singer ve Garth Nicolson biyolojik membranlar için akışkan mozaik modeli ileri sürdüler. Modellerinin temelinde, membranların düzenlenmiş globuler proteinler ve lipidlerin iki boyutlu çözeltileri olduğu fikri yatar (Şekil 7.4).

Bu modeli destekleyen birçok deneysel gözlemler mevcuttur. Modelin başlıca özellikleri şunlardır:

1.Membranların çoğunda glikolipidler ve fosfolipidler ikili tabaka teşkil etmişlerdir. Bu tabakanın iki görevi vardır: (a) Proteinler için bir solventtir, (b) Geçirgenlik barajıdır.

2.Membran lipidlerinin çok az bir kısmı bazı membran proteinleri ile etkileşirler, belki de onların aktiviteleri için gereklidirler.

3.Membran proteinleri membran düzleminde yana doğru (lateral) difüze olabilirler. Fakat membranın bir yüzeyinden diğerine dönmezler.



Şekil 7.4. Akışkan mozaik modeli.

8.BÖLÜM: N Ü K L E İ K A S İ T L E R

Deoksiribonükleik asit (DNA) ve ribonükleik asit (RNA), genetik bilgilerin muhafazası ve taşınması görevini üstlenen zincir şeklindeki makromoleküllerdir. Bütün hücrelerin kuru ağırlığının % 5-15'ini oluştururlar. Nükleik asit adı, ilk defa DNA'nın hücre çekirdeğinden izole edilmesinden gelmektedir. Gerçekte DNA ve RNA, hücrenin diğer bölümlerinde de bulunmaktadır.

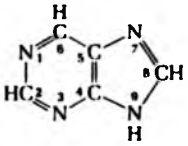
Proteinlerin yapı taşları amino asitler olduğu gibi, nükleik asitlerin de yapı taşları nükleotidlerdir. Bu bölümde önce nükleotidlerin yapı ve özellikleri anlatılacak, daha sonra DNA ve RNA'nın kovalent zincir omurgasının yapısı hakkında bilgi verilecektir. Nükleik asitlerin üç boyutlu yapıları ve biyolojik fonksiyonları Biyokimya-II derslerinde işlenecektir.

8.1. NÜKLEOTİDLERİN YAPISI VE ÖZELLİKLERİ

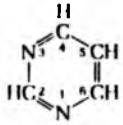
Bir nükleotid, azotlu heterosiklik bir baz, bir şeker ve bir veya daha fazla fosfat grubundan oluşmuştur. Şimdi nükleotidlerin ihtiva ettiği birimleri oluşum sırasına göre inceleyelim.

8.1.a. Pürin ve Pirimidin Bazları

Nükleotidlerde başlıca iki sınıf baz vardır: pürin ve pirimidin bazları. Bütün bazlar pürin ve pirimidinin türevleridir:

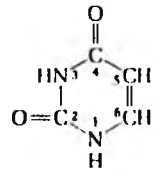


Pürin

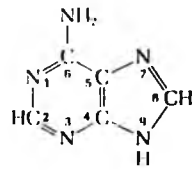


Pirimidin

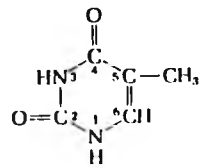
Her ikisi de aromatik karakterdedir. Pürin, bir pirimidin ve ona bitişik bir imidazol halkasından oluştuğundan pirimidin türevi olarak da telakki edilebilir. Nükleotidlerde bulunan başlıca azotlu bazlar; urasil, timin ve sitozin pirimidinleri ile adenin ve guanin pürinleridir (Şekil 8.1)



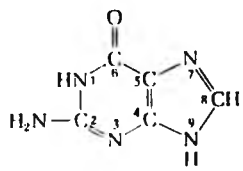
Urasil



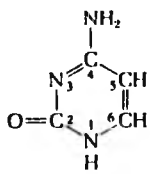
Adenin



Timin



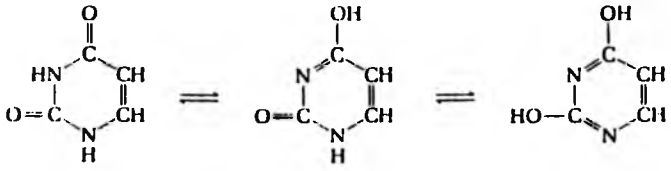
Guanin



Sitozin

Şekil 8.1. Nükleotidlerin yapısında yer alan başlıca pürin ve pirimidin bazları.

Pürin ve pirimidin bazları serbest halde iken suda pek çözünmezler. pH'ya bağlı olarak zayıf bazların iki veya daha fazla tautomerisi olabilir. Meselâ urasil laktam ve laktim olmak üzere iki şekilde olabilir; pH 7,0'de laktam şekli hâkimdir.



Laktam şekli Laktim şekli Çift laktim şekli

Burada saydığımız bazlar dışında çok sayıda pürin ve pirimidin türevleri vardır. Nadir bazlar olarak adlandırılan bu bazlar, nükleik asitlerde küçük miktarda bulunurlar. Nadir bazlar, genelde normal pürin ve pirimidin bazlarının metil türevleridir. Bunun yanında asetil, izopentenil veya hidroksimetil türevleri de mevcuttur (Tablo 8.1).

Nükleik asitlerin bütün pürin ve pirimidin bazları, 260-280 nm de ultraviyole ışığı kuvvetle absorblarlar. Bundan faydalanarak serbest bazların ve aynı zamanda nükleosit ve nükleotidlerin kantitatif analizi yapılabilir. Kromatografik ve elektroforetik metodlarla pürin ve pirimidin bazları birbirinden kolayca ayrılabilir.

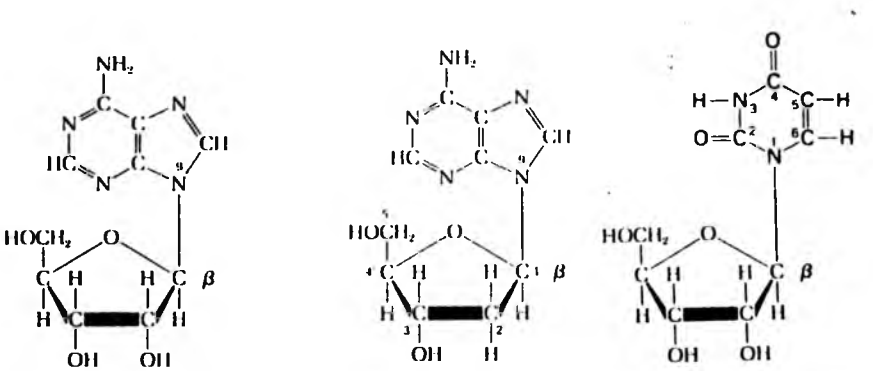
Tablo 8.1. Nükleik asitlerin bulunan nadir bazlar.

2-Tiyourasil	1-Metiladenin
5-Hidroksimetilurasil	2-Metiladenin
3-Metilurasil	N^6-Metiladenin
1-Metilurasil	N^6,N^6-Dimetiladenin
5,6-Dihidrourasil	N^6-(Δ^2-İzopentenil) adenin
N^4-Asetilsitozin	7-Metiladenin
3-Metilsitozin	1-Metilguanin
5-Metilsitozin	7-Metilguanin
5-Hidroksimetilsitozin	N^2-Metilguanin
	N^2,N^2-Dimetilguanin

8.1.b. Nükleositler

Pürin ve pirimidin bazlarının, bir D-riboz veya bir 2-deoksi-D-riboza bağlanmasıyla nükleositler oluşur. Bir nükleositte pentoz (D-riboz veya 2-deoksi-D-riboz)'un glikozidik 1 nolu karbonu, pirimidinin 1 nolu azotuna, pürinin ise 9 nolu azotuna bağlanmıştır. Bu N-glikozid bağı bütün tabii nükleositlerde β-şeklindedir.

Nükleositler ihtiva ettikleri pentozun cinsine göre ikiye ayrılırlar: ribonükleositler (D-riboz ihtiva ederler) ve deoksiribonükleositler (2-deoksi-D-riboz ihtiva ederler). Başlıca ribonükleositler; adenozin, guanozin, üridin ve sitidindir. Başlıca deoksiribonükleositler ise, deoksiadenozin, deoksiguanozin, deoksitimidin ve deoksisitidindir. Burada deoksi serisi için urasilin metillenmiş analoğu timinin yer aldığı görülmektedir. Nükleositlere örnek olarak adenozin, deoksiadenozin ve uridini verelim:



Adenozin Deoksiadenozin Uridin

Nükleositler, serbest bazlarına göre suda daha iyi çözünürler. Kromatografik metodlarla kolayca ayrılabilir ve teşhis edilebilirler. Bütün glikozidler gibi, nükleositler de alkalilere karşı nisbeten dayanıklıdırlar. Pürin nükleositleri asitlerle kolayca hidroliz olurlar.

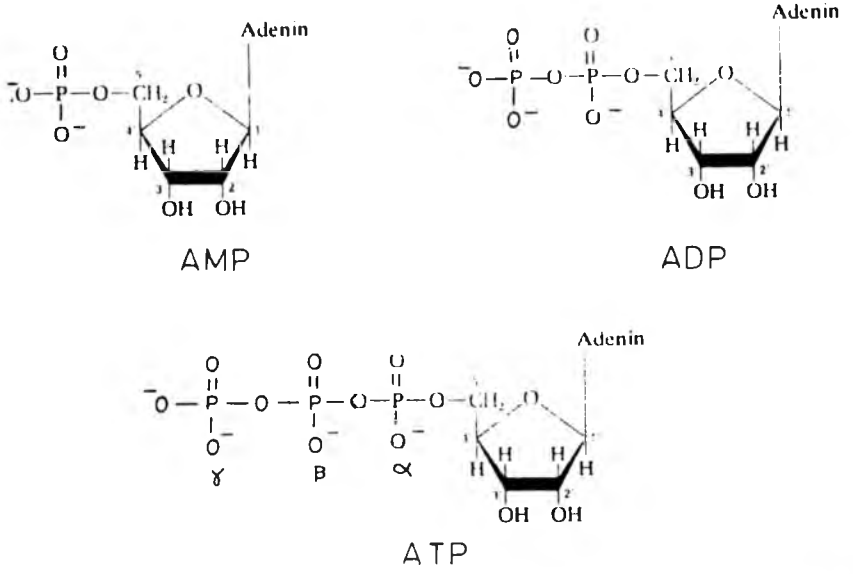
Buna mukabil pirimidin nükleositleri asidik hidrolize dayanıklıdırlar. Her iki nükleosit çeşidi spesifik nükleosidazlar vasıtasıyla parçalanırlar.

8.1.c. Nükleotidler

Nükleotidler, nükleositlerin fosfat esterleridir. Pentoz şekerinin en az bir hidroksil grubu esterleşmiştir. En çok rastlanan esterleşme 5 nolu karbon atomu üzerindedir. Böyle bir bileşik nükleosit-5'-fosfat veya 5'-nükleotid olarak gösterilir. Üstlü sayı pentoz şekerindeki bir karbon atomunu belirler. Üstsüz sayı ise, pürin ve pirimidin bazı halka atomlarından birisine işaret eder.

Adenozinin 5'-hidroksil grubunun esterleşmesi ile ortaya çıkan bileşik, adenozin 5'-fosfat veya kısaca adenilat şeklinde isimlendirilir. Bazen adenilik asit adı da verilen bu bileşiğin, fizyolojik şartlarda fosfat grubunun iyonlaşması sebebiyle adenilat şeklinde isimlendirilmesi daha uygundur. Bu bileşiğin kısaltılmış adı AMP (adenozin monofosfat)'dir. Diğer önemli 5'-ribonükleotidler guanilat (GMP), uridilat (UMP) ve sitidilat (CMP)'dır. 5'-Deoksiribonükleotidler ise, deoksiadenilat (dAMP), deoksiguanilat (dGMP), deoksitimidilat (dTMP) ve deoksisitidilat (dCMP)'dır. Tablo 8.2'de toplu halde bazlar, nükleositler ve nükleotidler gösterilmektedir.

Nükleosit 5'-difosfatta bir difosfat, nükleosit 5'-trifosfatta bir trifosfat grubu, pentoz şekerinin 5'-hidroksili ile ester bağı yapmıştır. Böylece adenin ribonükleotid serisi kısaltılmış olarak AMP, ADP ve ATP, deoksiribonükleotid serisi de dAMP, dADP ve dATP şeklinde gösterilir. Örnek olarak AMP, ADP ve ATP'nin açık formüllerini verelim:



Tablo 8.2. Baz, nükleosit ve nükleotidlerin isimlendirilmeleri.

Baz	Ribonükleosit	Ribonükleotid
Adenin (A)	Adenozin	Adenilat (AMP)
Guanin (G)	Guanozin	Guanilat (GMP)
Urasil (U)	Üridin	Üridilat (UMP)
Sitozin (C)	Sitidin	Sitidilat (CMP)

Baz	Deoksiribonükleosit	Deoksiribonükleotid
Adenin	Deoksiadenozin	Deoksiadenilat (dAMP)
Guanin	Deoksiguanozin	Deoksiguanilat (dGMP)
Timin	Deoksitimidin	Deoksitimidilat (dTMP)
Sitozin	Deoksisitidin	Deoksisitidilat (dCMP)

Serbest pürin ve pirimidin bazları ile serbest nükleositler çoğu hücrelerde eser miktarda bulunurken, ribonükleotid ve deoksiribonükleotidler önemli miktarda mevcutturlar. Nükleotidler, iyon değişim kromatografisi vasıtasıyla birbirlerinden kolayca ayrılabilirler.

Nükleosit-5'-difosfat ve nükleosit-5'-trifosfat NDP ve NTP şeklinde kısaltılır. Her iki tip nükleotid de nisbeten kuvvetli asidik olup, fosfat grupları 3 veya 4 proton verebilirler. Bu fosfat grupları, Mg^{+2} ve Ca^{+2} gibi iki değerlikli katyonlarla kompleks oluştururlar. Sitoplazmada nisbeten yüksek Mg^{+2} konsantrasyonu olduğundan, NDP ve NTP'ler tercihen Mg^{+2} kompleksi halinde bulunurlar. NDP ve NTP'lerin uç fosfat grupları spesifik enzimlerle parçalanabilirler. 1N HCl içinde 7 dakika kaynatma sırasında NTP'lerin β ve γ-fosfat grupları ve NDP'lerin β-fosfat grupları inorganik fosfatın açığa çıkmasıyla birlikte parçalanırlarken, NMP'lerin α-fosfat grupları etkilenmezler.

NTP'lerin önemli fonksiyonları vardır. ATP, değişik önemli enzimatik reaksiyonlarda fosfat ve pirofosfat grupları taşıyıcısı rolünü oynar. Aynı zamanda kimyasal enerjinin taşınması görevini de üstlenir. Spesifik biyosentez yollarında kimyasal enerji, diğer NTP'ler özellikle GTP, UTP ve CTP tarafından da taşınmaktadır.

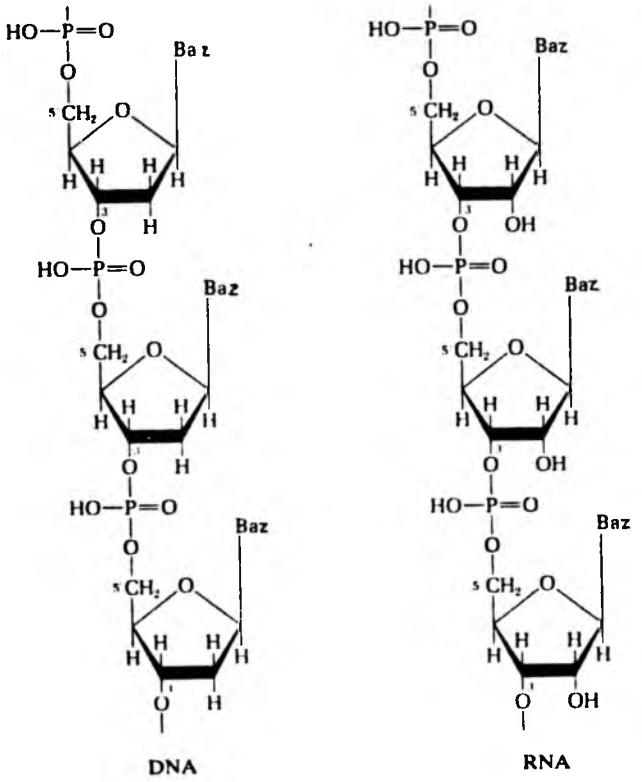
NTP ve NDP'lerin ikinci önemli fonksiyonları, özel yapı taşı moleküllerinin enerjice zengin taşıyıcıları olmalarıdır. Buna örnek olarak, glikojen sentezinde glukozun UDP-glukoz şeklinde reaksiyona girmesi verilebilir.

NTP ve dNTP'ler, DNA ve RNA sentezinde mononükleotid birimlerinin enerjice zengin ön bileşikleridir. NTP ve dNTP'lerin bütün fonksiyonları sırasında β- ve γ-fosfat gruplarında bulunan enerji, yeni kovalent bağların oluşmasında kullanılır.

Yukarıda sayılan nükleotidlerden başka, birçok hormonun etki mekanizmasında anahtar role sahip iki nükleotid bilinmektedir: siklik adenozin-3',5'-fosfat (cAMP) ve siklik guanozin-3',5'-fosfat (cGMP). Birçok koenzimler de nükleotidleri veya nükleotid türevlerini ihtiva ederler.

8.2. NÜKLEİK ASİTLERİN YAPISI VE HÜCRELERDEKİ DAĞILIMI

DNA ve RNA, kimyasal ve fiziksel özellikleri yönünden birbirlerine çok benzerler. DNA deoksiribonükleotidlerin, RNA ise ribonükleotidlerin kovalent bağlanmış zincirlerinden meydana gelmişlerdir. Zincirler, bir nükleotidin 5'-hidroksil grubu ile bunu takip eden nükleotidin 3'-hidroksil grubu arasında fosfodiester köprüsü ile oluşturulur (Şekil 8.2).



Şekil 8.2. DNA ve RNA'nın yapısı.

8.2.a.Deoksiribonükleik Asit

Farklı hücreler ve virüslerin DNA-molekülleri, en

önemli dört nükleotid monomerini değişik oranlarda ihtiva ederler (Tablo 8.3). DNA moleküllerinin nükleotid monomer sayıları ve dizilişleri canlı türüne göre farklılık gösterir. Bütün DNA çeşitlerinde bulunan adenin, guanin, timin ve sitozin bazlarının yanında, bazı DNA molekülleri bu bazların metil türevlerini de ihtiva ederler. DNA molekülleri, komplamenter çift heliks şeklinde düzenlenmiş iki zincir halindedir. Prokaryotik hücreler bir tek çift heliks halindeki DNA'dan oluşan bir kromozom taşırlar; iki zincirli makromolekülün molekül ağırlığı 2.10^9'un üzerindedir. Ökaryotik hücreler ise çok sayıda kromozoma sahiptirler; her kromozom ise birçok DNA molekülünden teşekkül etmiştir. Bakterilerde DNA molekülleri proteinlerle birleşmemiştir. Bazen bakteri sitoplazmasında ekstrakromozomal DNA moleküllerine de rastlanır. Kromozomal DNA ile genetik ilişkilerine göre plazmid veya epizom adı verilen bu DNA molekülleri, kromozomlara nisbeten küçüktür.

Tablo 8.3. Bazı nükleik asitlerde % baz oranları.

	Adenin	Guanin	Sitozin	Timin	Urasil
			DNA		
İnsan	30,9	19,9	19,8	29,4	-
E.coli	24,7	26,0	25,7	23,6	-
Bakteriofaj λ	21,3	28,6	27,2	22,9	-
			RNA		
Sığır karaciğeri (karışım)	17,1	27,3	33,9	-	21,7
E.coli mRNA	25,1	27,1	24,1	-	23,7
Tütün mozaik virüsü	29,8	25,4	18,5	-	26,7

Ökaryotik hücrelerde hemen hemen bütün DNA molekülleri hücre çekirdeğinde lokalize olmuştur ve bazik histon proteinleriyle kompleks yapmış durumdadır. Bunların ya-

nında mitokondrilerde de az miktarda DNA vardır. Yine fotosentetik hücrelerin kloroplastlarında da özel küçük bir DNA molekülü vardır. Mitokondri ve kloroplast DNA'ları, prokaryot hücre DNA'larına benzer özelliklere sahiptirler. DNA'nın özellikleri ve replikasyonu Biyokimya-II derslerinde işlendiğinden burada daha fazla teferruata girilmeyecektir.

8.2.b. Ribonükleik Asit

Hücrelerde birbirinden farklı üç çeşit RNA mevcuttur: messenger veya haberci RNA (mRNA), transfer RNA (tRNA) ve ribozomal RNA (rRNA). Bu üç çeşit RNA'lar karakteristik molekül ağırlıkları aralığı ve sedimentasyon katsayılarına sahiptirler (Tablo 8.4). Bütün RNA çeşitleri adenin, guanin, sitozin ve urasil bazları ihtiva ederler. Bunların yanında nadir bazlardan da yapılarında bulunabilir. DNA'da olduğu gibi RNA molekülleri de değişik canlılarda farklı sayı ve dizilişte nükleotid monomerlerinden meydana gelmişlerdir (Tablo 8.3). Bazı virüslerin dışında bütün canlılarda RNA molekülleri tek zincir yapısındadır. Ancak RNA molekülleri saç tokası benzeri dönüşlerle ortaya çıkan çift sarmal yapılı bölgeler ihtiva ederler. Değişik RNA çeşitlerinde sarmal bölgelerin oranı çok farklılık gösterirken genelde % 50 civarındadır.

Bakteri hücrelerinde hemen hemen bütün RNA'lar sitoplazmada bulunur. Sadece küçük bir kısım RNA, transkripsiyon (RNA sentezi) sırasında DNA'ya bağlı durumdadır. Ökaryotik hücrelerde değişik RNA'lar, hücrenin farklı kompartımanlarında farklı oranlarda mevcutturlar. Meselâ, bir karaciğer hücresinin toplam RNA'larının yaklaşık % 11'i çekirdekte, % 15'i mitokondrilerde, % 50'si ribozomlarda ve % 24'ü sitozolde bulunmaktadır.

Farklı RNA'ların yapısal özellikleri ve fonksiyonları transkripsiyon ve translasyon (protein sentezi) konularının işlendiği Biyokimya-II derslerinde işlendiğinden burada izah edilmeyecektir.

Tablo 8.4. E.coli RNA'larının özellikleri

Çeşit	Sedimentasyon katsayısı	Molekül ağırlığı	Nükleotid sayısı	Toplam RNA'nın yüzdesi
mRNA	6S-25S	25.000-1.000.000	75-3.000	~2
tRNA	4S	23.000 - 30.000	75 - 90	16
rRNA	5S	~35.000	~ 100	
	16S	~ 550.000	~ 1.500	82
	23S	~ 1.100.000	~ 3.100	

8.3. NÜKLEİK ASİTLERİN ASİT, BAZ VE ENZİMLERLE HİDROLİZİ

DNA, zayıf asidik şartlarda çok spesifik olarak hidroliz olur. Bu sırada sadece pürin bazları uzaklaşırken, pirimidin ve deoksiriboz arasındaki bağlar ile fosfodiester bağları etkilenmezler. Sonuçta bütün pürin bazları uzaklaşmış olan DNA türevine apurin asidi denir. Belirli başka kimyasal şartlar altında pirimidin bazları da uzaklaştırılabilir; bu şekilde oluşan DNA türevine ise apirimidin asidi denir.

DNA seyreltik bazlara karşı dayanıklı iken, RNA 2'-hidroksil grubundan dolayı hidroliz olur. Seyreltik NaOH çözeltisi, RNA'yı siklik nükleosit-2',3'-monofosfat üzerinden nükleosit 2'- ve 3'- fosfatlar karışımına dönüştürür.

DNA ve RNA'ları fosfodiester köprüleri a ve b (veya 3' ve 5') ile gösterilen iki enzim grubu tarafından da hidrolizlenir. a- veya 3'-enzimleri, sadece 3'-karbon atomu ve fosfat grubu arasındaki ester bağını spesifik olarak hidrolizlerken, b- veya 5'-enzimleri sadece fosfat grubu ve 5'-karbon atomu arasındaki ester bağını parça-

lar. Ayrıca polinükleotid zincirlerini sadece uçtan hidrolizleyebilen nükleazlara ekzonükleazlar, polinükleotid zincirlerini ortadan hidrolizleyenlere ise endonükleazlar denir.

Polinükleotidlerin enzimatik veya kimyasal metodlarla spesifik hidrolizi yoluyla nükleik asitlerin baz sıralanışı belirlenebilir.

9.BÖLÜM: V İ T A M İ N L E R

Bir canlı hücrenin ana kütlesini oluşturan proteinler, nükleik asitler, karbohidratlar ve lipidlerin yanında eser miktarda mevcut olan vitamin adı verilen belirli organik maddeler vardır. Vitaminin kelime manası hayat aminidir. Bugün vitamin sınıfına giren maddelerin birçoğu amin yapısında olmamasına rağmen, bu isim kullanılmaktadır. Vitaminlerin diğer organik besin maddelerinden farkı, doku yapısına girmemeleri ve organizmaya enerji sağlamamalarıdır. Vitaminler bazı organizmalar tarafından yapılamaz, dolayısıyla eksojen maddelerdir.

Vitaminler suda çözünenler ve yağda çözünenler olarak iki büyük sınıfa ayrılırlar (Tablo 9.1). Suda çözünen vitaminler, B grubu vitaminleri ve C vitaminidir. C vitamini hariç bütün suda çözünen vitaminlerin koenzim fonksiyonları çok iyi bilinmektedir. Yağda çözünen vitaminler ise A,D,E ve K vitaminleridir. Bu vitaminleri yüksek hayvanlar eksojen kaynaklardan temin etmelidirler; bitkiler ve mikroorganizmalar için esensiyal rolleri ispatlanamamıştır. Bu vitaminler muhtemelen koenzimlerin bileşeni değildirler, diğer olaylara eser miktarda katılması gereken bileşiklerdir.

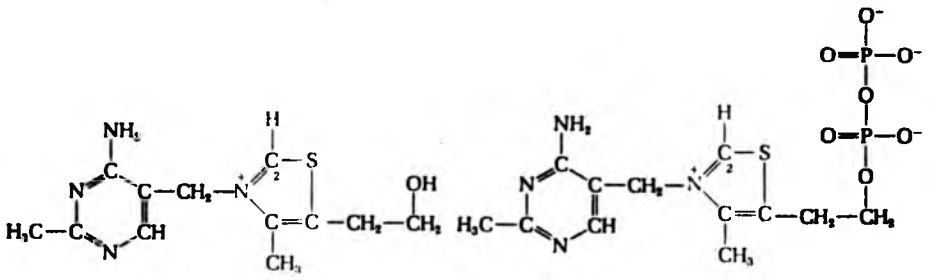
9.1. SUDA ÇÖZÜNEN VİTAMİNLER

9.1.a. Tiamin (B_1 Vitamini)

Tiamin, çoğu omurgalılar ve bazı mikroorganizmalar için zaruri olan bir vitamindir. Tiamin, bir metilen grubu üzerinden substitüe bir tiyazol halkasıyla bağlı bir substitüe pirimidinden meydana gelmiştir (Şekil 9.1). Hücrelerde büyük oranda aktif koenzim formu olan tiamin-pirofosfat halinde bulunur.

Tablo 9.1. Vitaminler ve fonksiyonları.

Vitamin tipi ve adı	Koenzim veya aktif formu	Fonksiyonu
SUDA ÇÖZÜNENLER		
Tiamin	Tiaminpirofosfat (TPP)	Aldehit grubu taşınması
Riboflavin	Flavinmononükleotid(FMN)	Hidrojen atomu (elektron) taşınması
	Flavin adenin dinükleotid (FAD)	" "
Nikotinamid	Nikotinamid adenin dinükleotid (NAD^+)	" "
	Nikotinamid adenin dinükleotidfosfat($NADP^+$)	" "
Pantotenik asit	Koenzim A (CoA)	Açil grubu taşınması
Piridoksin	Piridoksal fosfat	Amino grubu taşınması
Biyotin	Biyositin	Karboksil grubu "
Folik asit	Tetrahidrofolat	C_1-gruplarının "
Vitamin B_{12}	Koenzim B_{12}	Hidrojen atomlarının 1,2-kayması
Lipoik asit	Lipoillisin	Hidrojen atomu ve açil grubu taşınması
Askorbik asit	-	Hidroksilasyonlarda kofaktör
YAĞDA ÇÖZÜNENLER		
A vitamini	11-cis-Retinal	Görme siklüsü
D vitamini	1,25-Dihidroksikolekalsiferol	Kalsiyum ve fosfat metabolizması
E vitamini	-	Antioksidan
K vitamini	-	Protrombin biyosentezi



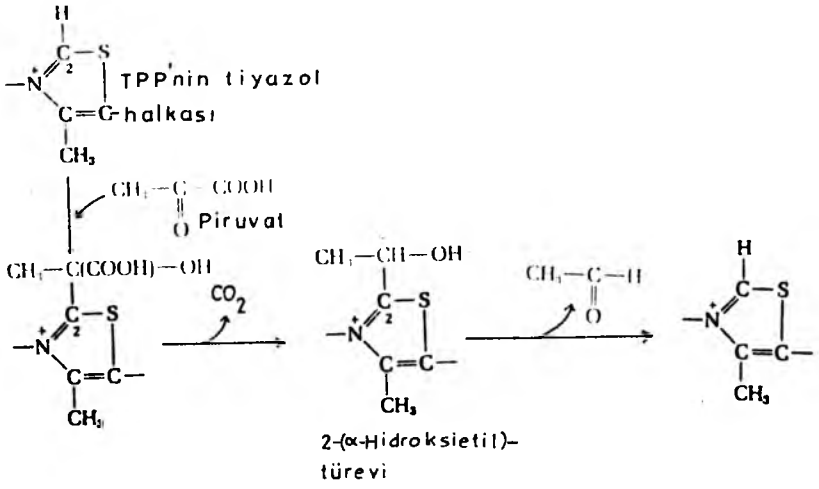
Tiamin Tiaminpirofosfat

Şekil 9.1. Tiamin ve tiaminpirofosfatın kimyasal yapıları: Substitüe tiyazol molekülün aktif kısmıdır.

Tiaminpirofosfat, iki sınıf enzimle katalizlenen reaksiyonda koenzim rolü oynar. Her ikisi de karbohidratların ana metabolizma yolunda aldehit gruplarının uzaklaştırılması ve/veya taşınmasında rol oynarlar; (1) α -keto asitlerin dekarboksilasyonunda ve (2) α -keto cisimlerinin oluşumunda veya yıkımında. Bu reaksiyonlarda tiaminpirofosfatın tiyazol halkası, kovalent bağlı aktif bir aldehit grubunun taşıyıcısı rolünü oynar. Mg^{+2} kofaktör olarak gereklidir.

Tiaminpirofosfatın α-keto asitlerinin dekarboksilasyonunda oynadığı rolünü piruvik asidin asetaldehide dönüşme reaksiyonlarıyla izah edelim: Tiyazol halkasının 2 pozisyonundaki hidrojeni bir karbanyonun oluşumuyla iyonize olur. Karbanyon iyonu, piruvatın karbonil karbon atomuyla reaksiyona girerek, CO_2 çıkmasıyla birlikte tiyazol halkasının hidroksietil türevine dönüşür. Bu hidroksiletil grubu ya asetaldehide dönüşecek şekilde hidroliz olur veya okside olarak bir açil grubuna çevrilir (Şekil 9.2).

Tiamin en çok bira mayasında ve buğday, pirinç, arpa gibi tahılların kabuğunda bulunur. Bundan başka fasulye, bezelye, ceviz vb.'de beslenme bakımından yeter miktarda vardır.

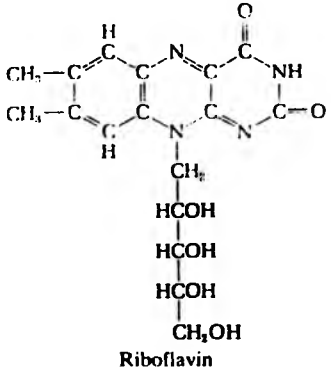


Şekil 9.2. Piruvat dekarboksilaz vasıtasıyla piruvatın dekarboksilasyonunda tiaminpirofosfatın etkisinin basamakları.

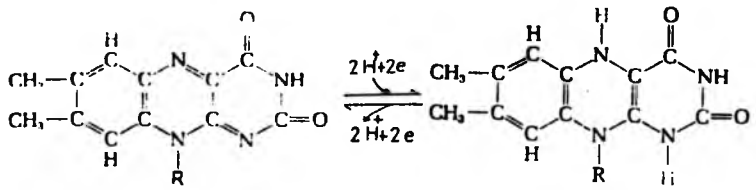
9.1.b. Riboflavin (B_2 Vitamini)

B_2 vitamini ilk defa sütten elde edildiği için laktoflavin adını da alır. Bütün bitkiler ve birçok mikroorganizmalar tarafından sentezlenebildiği halde yüksek hayvanlarca sentezlenemez.

Riboflavin bir izoalloksazin türevidir. 10 nolu azota, ribozun indirgenmesiyle meydana gelen ribitol takılıdır.



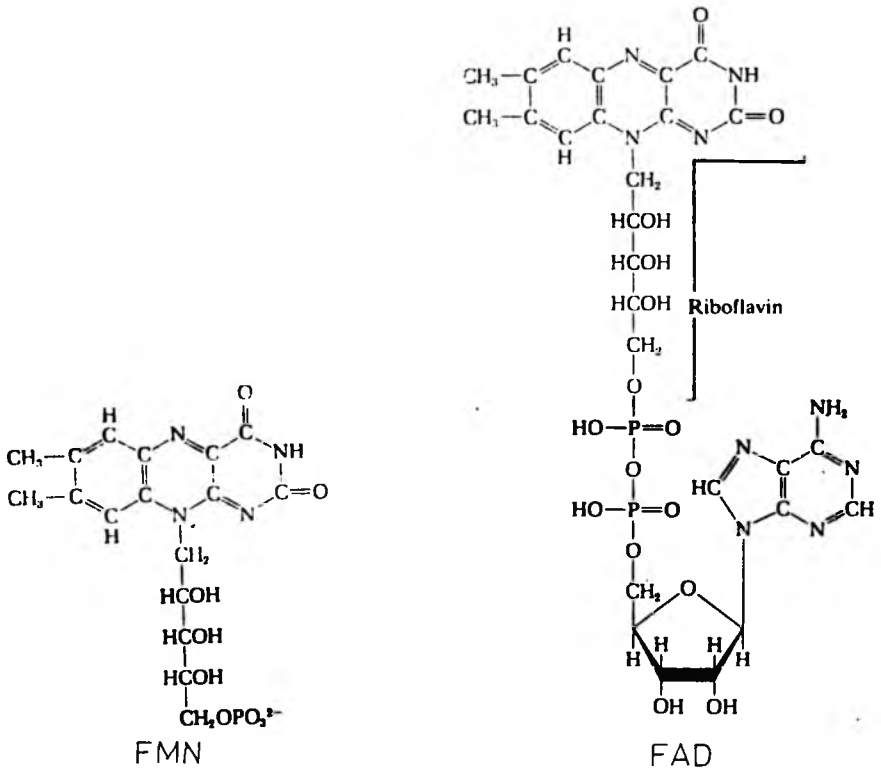
Riboflavinin ribitil grubunun 5'-karbon atomuna fosforik asit bağlanmasıyla flavin mononükleotid (FMN), bunun da adenilik asitle birleşmesiyle flavin adenin dinükleotid (FAD) meydana gelir (Şekil 9.3). Flavinnükleotidler flavoproteinler veya flavoenzimler olarak bilinen redoks enzimlerinin prostetik gruplarıdırlar. Bu enzimler piruvatın, yağ asitlerinin, amino asitlerin oksidatif yıkımına ve elektron taşınma olayına katılırlar. Çoğu flavoenzimlerde flavinnükleotidi proteine kovalent olmayan, fakat sıkı bir şekilde bağlıdır. Süksinat dehidrogenaz da istisnai durum olarak, FAD polipeptid zincirinin bir histidin kalıntısına kovalent bağlıdır. Metalflavoproteinler ek kofaktör olarak bir veya daha fazla metal ihtiva ederler. Flavinnükleotidler, flavoproteinin katalitik etkisi sırasında izoalloksazin halkasının reversibil bir indirgenmesine maruz kalırlar; bu sırada $FMNH_2$ ve $FADH_2$ ile adlandırılan indirgenmiş nükleotidler meydana gelir.



Yükseltgenmiş form İndirgenmiş form

Farklı flavoproteinlerin okside şekilleri oldukça renklidirler. Görünür bölgede kuvvetli absorbsiyon bandlarından dolayı karakteristik sarı, kırmızı veya yeşil renklere sahiptirler. İndirgenme sırasında flavoproteinler renksizleşirler; bu karakteristik değişiklikten aktivite ölçümlerinde yararlanılır.

Riboflavin ençok sütte, bira mayasında, ekmek mayasında, karaciğerde, ıspanakta, kuru fasulye, balık ve yumurtada bulunur.

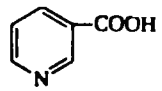


Şekil 9.3. FMN ve FAD'nin kimyasal yapısı.

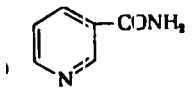
9.1.c. Nikotinamid (B_3 Vitamini)

Niasinamid adı da verilen B_3 vitamininin diğer adı PP vitaminidir. Bu ad pellegra adı verilen bir hastalığı önlemesi sebebiyle "pellegra preventive"den baş harfler alınarak verilmiştir. Nikotinik asidin de vitamin etkisi vardır; organizmada nikotinamide çevrilebildiği gibi, nikotinamid de nikotinik aside çevrilebilir.

Bitkiler ve çoğu hayvanlarda nikotinik asit, değişik yollarla özellikle triptofandan elde edilebilir. Hayvanlar triptofanca zengin proteinlerce beslenirse nikotinik asit eksikliği görülmez; aksine durumda eksiklik belirtileri görülür.



Nikotinik asit
(niasin)



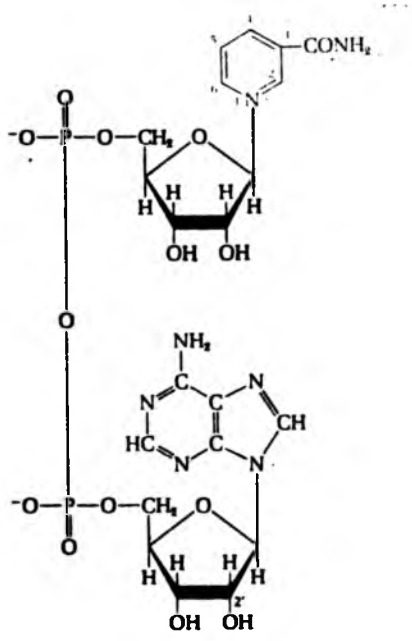
Nikotinamid

Nikotinamid ihtiva eden başlıca iki koenzim vardır: nikotinamid adenin dinükleotid (NAD^+) ve nikotinamid adenin dinükleotidfosfat ($NADP^+$). Her iki koenzim piridin koenzimi veya piridin nükleotidi olarak adlandırılır (Şekil 9.4). $NADP^+$'de NAD^+'den farklı olarak, adenine bağlı riboz biriminin 2'-hidroksil grubu fosfat ile ester yapmış haldedir.

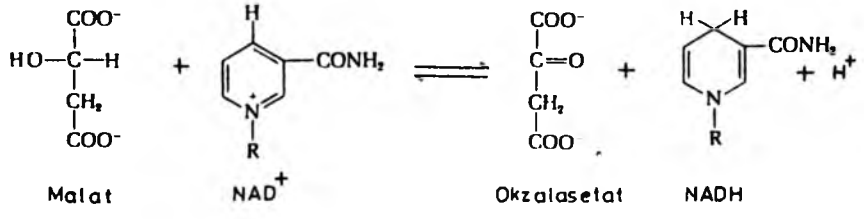
Piridin nükleotidleri, piridine bağımlı dehidrogenaz sınıfından oksidoredüktaz enzimlerinin koenzimi olarak fonksiyon görürler. Bu koenzimler, katalitik prosesleri esnasında proteine nisbeten gevşek bağlanmışlardır; spesifik substrat moleküllerinin hidrojen atomlarının uzaklaştırılması sırasında elektron alıcısı rolünü oynarlar. Bu reaksiyonlarda substrat üzerindeki hidrojen atomlarından birisi doğrudan koenzimin okside şeklinin nikotinamid kısmına (NAD^+ ve $NADP^+$'ye) aktarılırken, diğeri de H^+ iyonu halinde çözeltiye geçer. Buna örnek olarak, malatın okzalasetata dönüşme reaksiyonunu katalizleyen malat dehidrogenaz enzimi verilebilir (Şekil 9.5).

Genellikle piridine bağımlı dehidrogenazlar ya NAD^+ veya $NADP^+$ için spesifiktir; bununla birlikte glutamat dehidrogenaz gibi bazıları ise her iki koenzimle de çalışabilirler. NADPH tamamen indirgeyici biyosentez olaylarında görev alırken, NADH ATP sentezine katılır. Piridin nükleotidli dehidrogenazla katalizlenen reaksiyonlar, normal olarak reversibildir. NAD^+ ve $NADP^+$'nın indirgenmiş formları 340 nm de karakteristik absorbsiyon maksimu-

mu gösterirler; bu özelliklerinden piridin nükleotide bağımlı reaksiyonların akışını takib etmede yararlanılır.



Şekil 9.4. Nikotinamid adenin dinükleotid (NAD^+)'in yapısı.

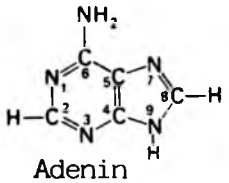


Şekil 9.5. Malat dehidrogenazın katalizlediği reaksiyonda hidrojen ve elektron alışverişi: Bunlardan biri piridinin 4 pozisyonuna hidrid iyonu olarak taşınır; diğeri ortama H^+ iyonu olarak salınır.

B_3 vitamini en çok ette ve özellikle karaciğerde bulunur. Bundan başka bira mayası, yeşil sebzeler, çay, kahve, ceviz, fındık, buğday, çavdar, baklagiller de bu vitamin için iyi bir kaynaktır.

9.1.d. Adenin (B_4 Vitamini)

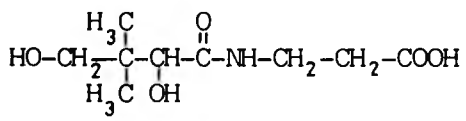
Bir çeşit pürin bazı olan adenin, tabiatta çok yaygın olup hayvan ve bitkilerin doku hücrelerinde nikotinamid, D-riboz ve fosforik asitle birleşmiş halde bulunur. Nükleik asitlerin, NAD^+, $NADP^+$, FAD vb. kofaktörlerin yapısına girer.



Adenin

9.1.e. Pantotenik Asit (B_5 Vitamini)

Bir β-alanin türevi olan pantotenik asit, 2,4-dihidroksi-3,3-dimetilbutirik asit olan pantoik asidin karboksil grubuyla β-alaninin amino grubunun amid bağı ile bağlanmasından meydana gelmiştir. Bitkiler ve çoğu mikro-



Pantotenik asit

organizmalar tarafından sentezlenen pantotenik asit, omurgalılar için de çok zaruri bir vitamindir.

İnsan ve hayvan organizmasında pantotenik asidin önemi, koenzim A'nın yapısında bulunmasından ileri gelir. Koenzim A başlıca üç birimden oluşmuştur: β-merkaptoetilamin, pantotenik asit ve ribozun 3'-hidroksil grubu fosforilleşmiş ADP (Şekil 9.6). Aktif grup uç sülfhidril

(-SH) grubudur. Koenzim A (CoA) açil grubu taşıyıcısı olarak şu enzimatik reaksiyonlara iştirak eder; yağ asitleri oksidasyonu, yağ asitleri sentezi, piruvatın oksidasyonu ve biyolojik asetilleme reaksiyonları. CoA'ya ençok bağlı olan açil grubu asetildir ve buna da asetil CoA adı verilir.

Açil CoA Asetil CoA

Asetil CoA çok negatif bir hidroliz ΔG° değerine sahiptir;

Asetil CoA+H_2O $\rightleftharpoons$ Asetat + CoA + H^+ ΔG°=-7,5 kcal/mol.

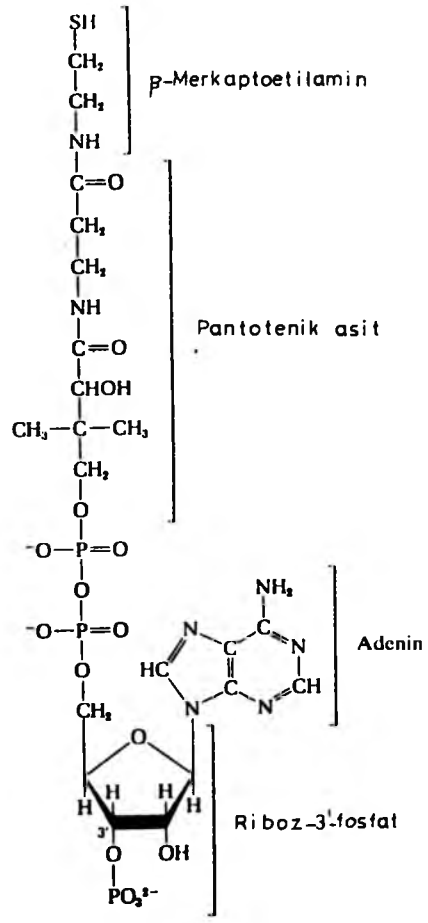
Diğer bir deyişle asetil CoA, yüksek bir asetil grubu transfer potansiyeline sahiptir. ATP, aktifleşmiş fosfat taşıyıcısı olduğu gibi, CoA da aktifleşmiş açil ve asetil grupları taşıyıcısıdır.

Pantotenik asit, karaciğer, böbrek, yumurta, bira mayası, bezelye, kuru fasulye, süzme bal, karnıbahar ve lahanada çok miktarda mevcuttur.

9.1.f. Piridoksin (B_6 Vitamini)

2-Metil-3-hidroksi-4,5-dihidroksimetil piridin yapısında olan piridoksin (piridoksol), biyolojik olarak piridoksal ve pridoksamine dönüşebilir. B_6 vitamininin aktif koenzimleri de piridoksalfosfat ve piridoksaminfosfattır (Şekil 9.7).

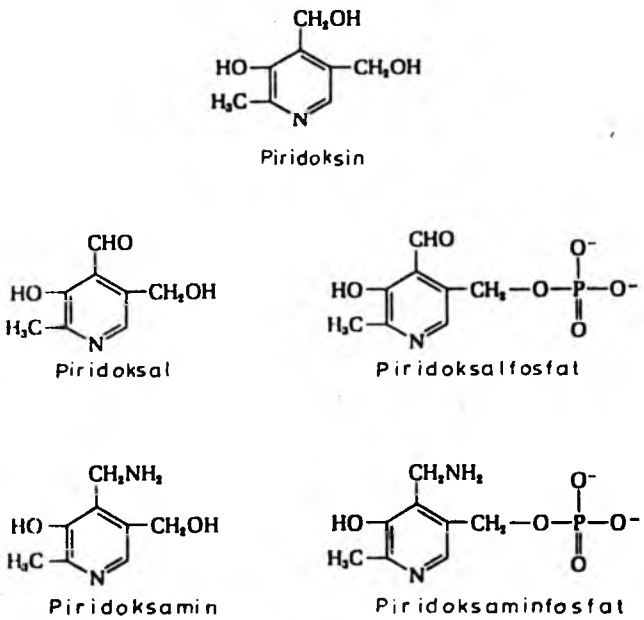
Piridoksin koenzimleri çok yönlü fonksiyona sahiptirler ve çok çeşitli enzimatik reaksiyonlara katılırlar. Piridoksal fosfatın zaruri koenzim olarak katıldığı genel bir enzimatik reaksiyon tipi transaminasyondur; bu reaksiyon tipinde bir amino asidin α-amino grubu bir α-keto



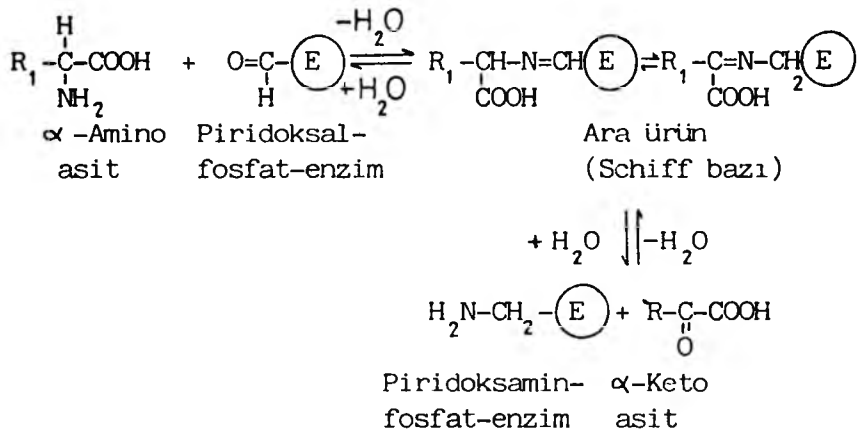
Şekil 9.6. Koenzim A'nın yapısı. Uç tiyol grubu bir açil grubuyla tiyoester bağı yapar.

asidin α -karbon atomuna taşınır. Bu gibi reaksiyonları katalizleyen enzimler transaminazlar veya aminotransferazlar olarak adlandırılır. Transaminasyon reaksiyonlarında, bir amino asidin α-amino grubuyla enzime bağlı piridoksal fosfat arasında bir Schiff bazı oluşur. Daha sonra bu amino grubu amino asitten ayrılır ve bir α-keto asit oluşur. Meydana gelen enzime bağlı piridoksaminfos-

fat bir başka ∝-keto asidiyle reaksiyona girer; sonuçta yeni bir amino asit ve piridoksalfosfat enzim kompleksi oluşur (Şekil 9.8).



Şekil 9.7. Piridoksin ve koenzim şekilleri.



Şekil 9.8. Aminotransferazlarda piridoksalfosfatın etki tarzı.

Piridoksalfosfatın transaminasyon reaksiyonları haricinde amino asitlerin ara metabolizmasının şu reaksiyonlarında da koenzim rolü vardır: α-amino asitlerin dekarboksilasyonu, molekülden H_2O ve H_2S'in uzaklaştırılması ve rasemizasyon. Yine glisin ve serinin birbirine dönüşmesinde koenzim olarak etki eden tetrahidrofolik asitle beraber piridoksal fosfata da ihtiyaç vardır.

B_6 vitamini en çok maya, pirinç kabukları, yumurta sarısı, tahıl ve sebzelerde ve daha az miktarda karaciğer, böbrek, balık ve sütte bulunur.

9.1.g. Biyotin

Biyotine H vitamini veya koenzim R de denir. Biyotin, birbiriyle kondanse olmuş bir imidazol ile bir tiyofen halkasından ve tiyofen halkasına bağlı bir valerik asitten ibarettir (Şekil 9.9).

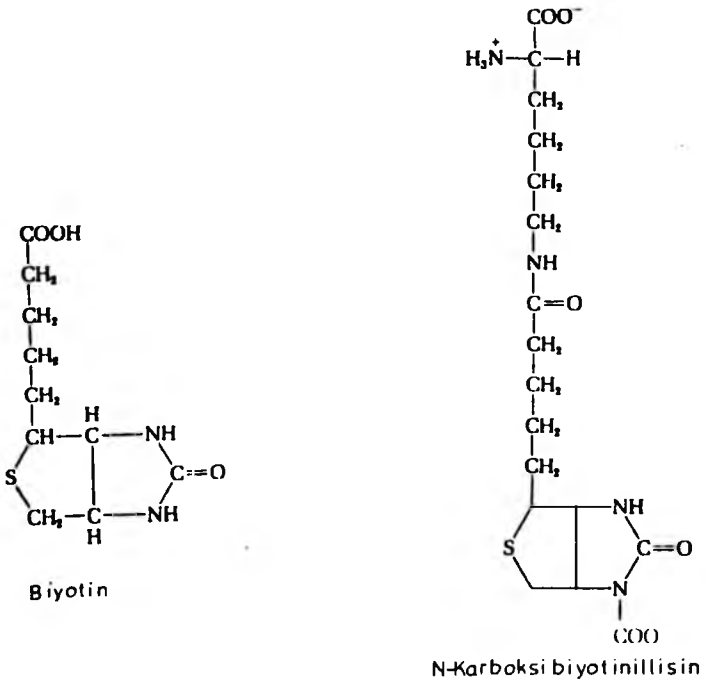
Biyotin, CO_2'nin enzimatik taşınmasında rol alan ve ayrıca β-keto asitleri dekarboksile eden enzimlerin prostetik grubunda bulunur. Örnek olarak, biyotin propiyonil CoA karboksilaza kovalent bağlanır; burada enzim proteinindeki spesifik bir lisinin ε-amino grubuyla biyotin molekülü arasında bir amid bağı oluşur. Bu bileşik biyotinlisin veya biyositin olarak adlandırılır. Propiyonil CoA-karboksilaz, asetil CoA karboksilaz gibi belirli karboksilleyici enzimlerde bağlı biyotin, karbondioksitin taşıyıcısı rolünü oynar; bu sırada çok dayanıksız olan karboksi biyotin olarak bulunur (Şekil 9.9). Böyle bir karboksilasyon reaksiyonunun toplam akışı şu denkleme göre vuku bulur:

$$ATP + HCO_3^- + \text{Biyotin-enzim} \rightleftharpoons ADP + P_i + \text{Karboksibiyotinil-enzim}$$

$$\text{Karboksibiyotinil-enzim} + \text{Substrat} \rightleftharpoons \text{Biyotinil-enzim} + \text{Karboksillenmiş substrat}$$

Biyotin en çok yumurta sarısında, karaciğerde, süt-

te, böbrekte ve mayada bulunur. Çiğ yumurta yendiği zaman organizma biyotinden yararlanamaz. Çünkü yumurta beyazında bulunan avidin adı verilen glikoprotein, biyotinle birleşerek sindirilemeyen bir kompleks meydana getirir ve dışkı ile atılır. Pişmiş yumurtada avidin denatüre olur ve biyotini bağlayamaz ve bu etki de ortadan kalkar.

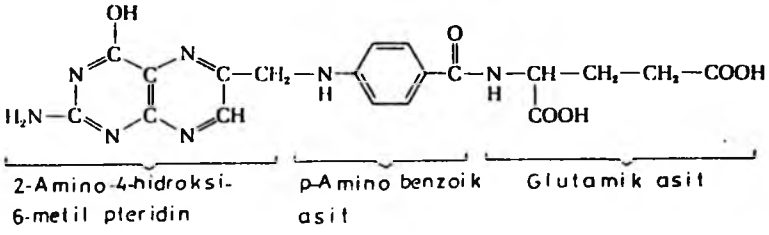


Şekil 9.9. Biyotin ve bir enzim-lisin kalıntısının biyotinil türevinin karboksillenmiş şekli.

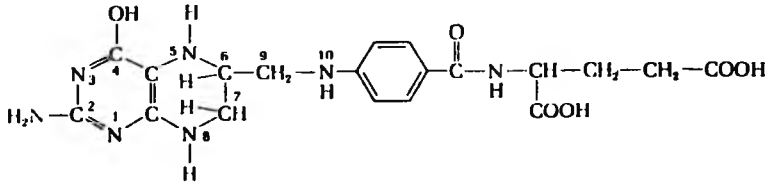
9.1.h.Folik Asit (B_{10} veya B_{11} Vitamini)

Folik asit, ilk olarak ıspanakta bulunmuş olup, bitkilerde oldukça yaygındır. Bağırsaklardaki mikroorganizmalar tarafından da sentezlenirler. Memelilerce sentezlenemezler; eksikliğinde üreme zayıflığı ve aneminin farklı şekilleri oluşur. Folik asit başlıca üç karakteristik yapı taşına sahiptir: substitüe bir pteridin, p-aminobenzoik asit ve glutamik asit. Folik asit pteroilglutamik asit olarak da adlandırılır. Bazen glutamik asidin δ-karboksil grubu üzerinden bir veya daha çok sayıda

glutamik asit bağlıdır. Folik asidin türevi tetrahidrofolik asittir (FH_4 veya THF); bu folik asidin 5,6,7 ve 8 nolu atomlarının hidrojenasyonuyla meydana gelir (Şekil 9.10). Besinlerde bulunan folik asit organizmada tetrahidrofolik aside dönüşebilir. Tetrahidrofolik asit, bir karbonlu birimlerin taşınması reaksiyonlarında koenzim olarak görev yapar.



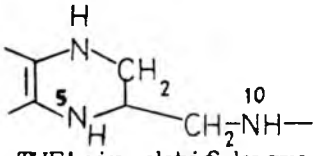
Folik asit



Tetrahidrofolik asit

Şekil 9.10. Folik asit ve tetrahidrofolik asidin yapısı. N^5 -ve N^{10}-azot atomları C_1-grubunun taşınmasında görev alır.

Tetrahidrofolat tarafından taşınan bir karbonlu birimler, 5 veya 10 nolu azot atomuna veya her ikisine birden bağlanırlar. Sözkonusu birimler üç oksidasyon durumuna sahip olabilirler (Tablo 9.2). En çok yükseltgenmiş bir karbon birimi olan CO_2 ise, biyotin tarafından taşınır.



THF'nin aktif kısmı.

Tablo 9.2. THF tarafından taşınan bir karbonlu birimler.

Oksidasyon derecesi	Grup
En çok indirgenmiş	$-CH_3$, metil
Az indirgenmiş	$-CH_2-$, metilen
En çok yükseltgenmiş	-CHO, formil
	-CH=NH, formimino
	-CH=, metenil

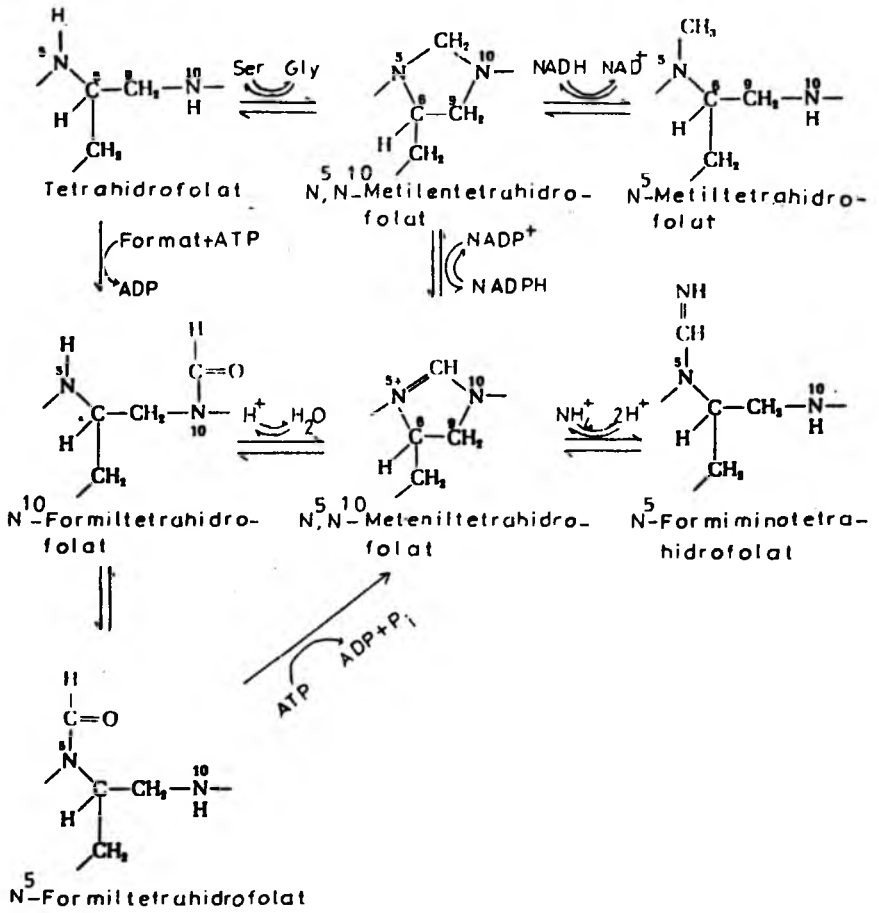
Tablo 9.2.'de sıralanan bir karbonlu birimler birbirlerine çevrilebilirler (Şekil 9.11). Meselâ, N^5 , N^{10}-metilentetrahidrofolat, N^5-metiltetrahidrofolata indirgenebilirken, N^5, N^{10}-meteniltetrahidrofolata da yükseltgenebilir ve buda aynı oksidasyon basamağındaki N^5-formiminotetrahidrofolat ve N^{10} - formil tetrahidrofolata çevrilebilir. N^{10}-formiltetrahidrofolat aynı zamanda format ve ATP'den de sentezlenir.

Metabolizma olaylarında en önde gelen bir karbonlu birim kaynağı serin olup, bu birimi glisine dönüşürken verir. Tetrahidrofolat türevlerinin katıldığı reaksiyonlara örnek olarak pürin halkasının sentezi, metiyoninden homosisteinin oluşumu reaksiyonlarını verebiliriz.

Folik asit, en çok yeşil yapraklarda ve karaciğerde bulunur.

9.1.1. Lipoik Asit

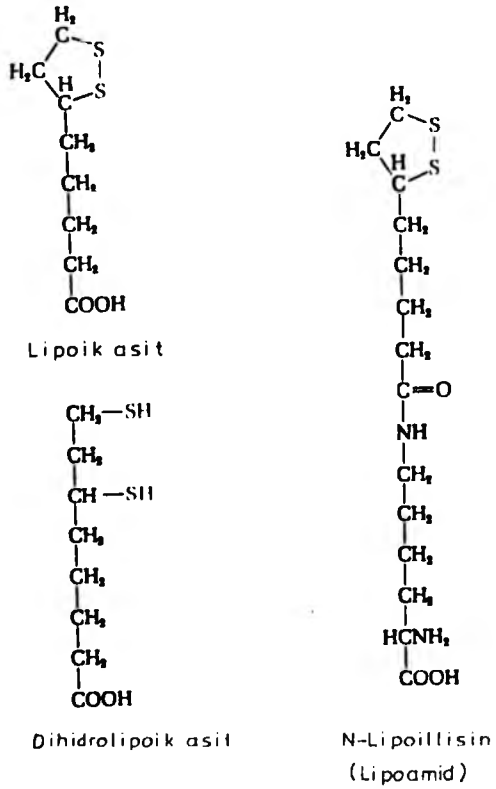
Bitkilerin çoğunda ve tiroid hariç bütün hayvansal



Şekil 9.11. Tetrahidrofolata bağlı bir karbonlu birimlerin birbirlerine dönüşümleri.

dokularda bulunan lipoik asit, 1,2-ditiolen-3-valerik asit kimyasal yapısındadır ve iki şekilde mevcuttur: siklik bir disülfit yapıda olan lipoik asit ve 6 ile 8 po-

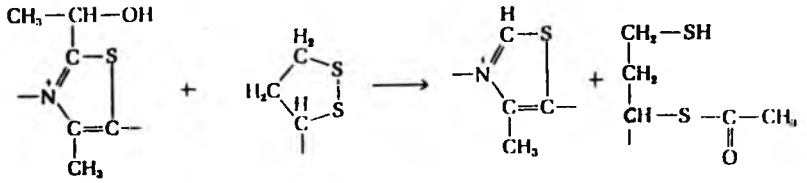
zisyonlarında birer sülfhidril grubu taşıyan indirgenmiş açık zincirli dihidrolipoik asit (Şekil 9.12). Redoks reaksiyonlarıyla bu iki şekil birbirine dönüşebilir.



Şekil 9.12. Lipoik asit ve türevleri.

Lipoik asit, piruvat ve diğer ∝-keto asitlerinin oksidatif dekarboksilasyonunda koenzimlerden biri olarak etki eder; bu kompleks reaksiyonlara birçok koenzim iştirak eder. Piruvat, önce karboksil grubunu kaybeder ve enzime bağlı tiaminpirofosfatın hidroksietil türevi oluşur. Son olarak dihidrolipoil transasetilaz enzimine bağlı lipoik asitle reaksiyon olur; bu sırada elektronlar ve açil grubu taşınarak 6-asetil dihidrolipoik asit oluşur (Şekil 9.13). Daha sonra lipoik asit rejenere olur; açil grubu koenzim A üzerine taşınır ve tiyol grupları elekt-

ron transferiyle tekrar okside olarak siklik yapıda lipoik asit meydana gelir. Lipoik asit, dihidrolipoil transasetilaz üzerindeki spesifik bir lisinin ε-amino grubuyla bir amid bağıyla bağlanır; bu lipoillisin kısmı lipoamid olarak adlandırılır.



TPP'nin tiyazol halkasının hidroksietil türevi

Lipoik asidin disülfit halkası

TPP'nin serbest tiyazol halkası

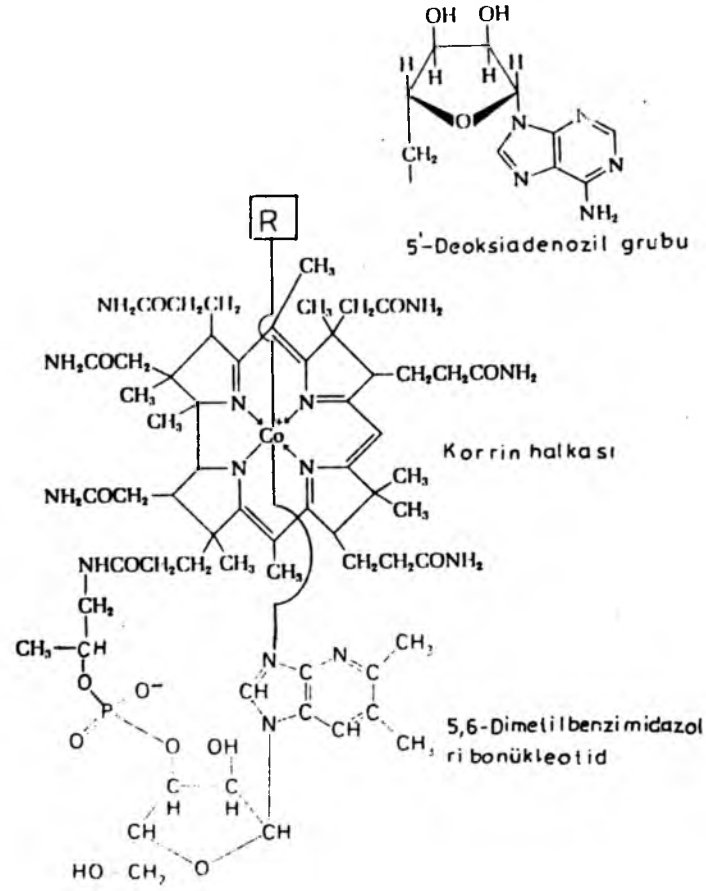
6-Asetil dihidrolipoik asit

Şekil 9.13. Tiaminpirofosfattan bir asetil grubunun ve hidrojen atomlarının lipoik asit üzerine taşınması.

9.1.i. Kobalamin (B_{12} Vitamini)

Siyanokobalamin olarak adlandırılan B_{12} vitamini iki karakteristik komponentten ibarettir. Bu komponentlerden birisi, hemoglobinin porfirin halka sistemine benzeyen korrin halka sistemidir; farklı olarak dört pirrol halkasından ikisi birbirine metenil köprüsü ile değil doğrudan doğruya bağlıdır. Halka sisteminin içinde merkezi pozisyonda bulunan kobalt atomu, dört pirrol halkasının azot atomlarından birindeki hidrojenin yerine geçmiş ve diğer üç azot atomu ile koordine kovalent bağ meydana getirmiştir. B_{12} vitamininin ikinci komponenti, D-riboza α-N-glikozid bağıyla bağlanmış 5,6-dimetilbenzimidazol bazıdır. Bu çoğu diğer nükleotidlerde hâkim olan β-bağından istisna gösterir. Ribonükleotid hem diğer azot atomunun bir koordinasyon bağı ile kobalt atomuna bağlanır, hem de 3'-fosfat grubu ile korrin halkasının yan zinciri-

ne bir ester bağıyla bağlanır. Kobalt atomunun altıncı koordinasyon yerinde bir siyanür iyonu bağlanmışsa, siyanokobalamin adını alır. Siyanür iyonu yerine nitrit, sülfit ve hidroksit iyonlu benzer kompleksler de bilinmektedir. Koenzim B_{12} de siyanür ligandı yerine 5'-deoksiadenozil grubu geçmiştir. Bu bileşikte 5'-deoksiadenozil grubunun C-5 atomu merkezdeki kobalt atomuna kovalent bir bağla bağlıdır (Şekil 9.14). B_{12} vitamininin diğer şekli olan pseudovitamin B_{12} , ribonükleotidinde 5,6-dimetilbenzimidazol yerine adenin ihtiva eder.



Şekil 9.14. B_{12} vitamini ve türevleri. Siyanokobalaminde R siyanürdür. Deoksiadenozilkobalaminde (koenzim B_{12}) R, bir 5'-deoksiadenozil grubudur.

Hayvanlar ve bitkiler B_{12} vitaminini kendileri sentezleyemezler, ancak belirli mikroorganizmalar tarafından sentezlenir. Besinlerde bulunan B_{12} vitamini, mide özsuyunda bulunan "intrinsik faktör" adı verilen spesifik bir glikoprotein tarafından bağlanır ve ince bağırsaklardan emilir; daha sonra transkobalamin proteinlerince bağlanarak dokulara taşınır.

Koenzim B_{12} değişik enzimlerin etkileri için gereklidir. Koenzim B_{12} 'nin iştirak ettiği enzimatik reaksiyonlarda, substrat molekülünün bir karbon atomunun bir hidrojen atomu komşu karbona 1,2- kayması gösterir, aynı zamanda hidroksil, amino, alkil veya karboksil grubu gibi bir diğer grup aksine 2,1-kayması gösterir:

Bu reaksiyonun mekanizması henüz tam aydınlatılamamıştır. Muhtemelen koenzim B_{12} enzimatik olarak substrat molekülünden ayrılmış bir hidrit iyonuyla reaksiyona girer; bu sırada hidrit iyonu, 5'-deoksiadenozil grubunun kobalt atomuyla bağlanan metilen karbon atomunu uzaklaştırır. Hidrit iyonu daha sonra substratın komşu karbon atomuna taşınır; bu sırada diğer grupların kayması paralel meydana gelir. Bu gibi reaksiyonlarda kobalt atomu muhtemelen +2 basamağında bulunur. Koenzim B_{12} 'nin diğer önemli bir reaksiyonu, ribonükleosit-5'-trifosfatın 2'-karbon atomunun karşılık gelen 2'-deoksiribonükleosittrifosfatlara indirgenmesinde görülür.

B_{12} vitamininin katıldığı ikinci bir sınıf enzimatik reaksiyonlarda koenzim, kobalt atomunun 6. koordinasyon pozisyonunda 5'-deoksiadenozil grubu yerine bir metil grubu ihtiva eden metilkobalamindir. Bu reaksiyonlarda metilkobalamin, N^5-metiltetrahidrofolat ile birlikte bir metil grubunun belirli akseptör moleküllere taşınmasında taşıyıcı rolünü oynar. Bu akseptör moleküllerin başında metiyonine dönüşen homosistein gelir.

B_{12} vitamini etkisini gösteren maddeler en çok karaciğer ve böbrekte olmak üzere et, süt, yumurta ve balıkta bulunur.

9.1.j. C Vitamini

C vitamini askorbik asit olarak da adlandırılır. Yapı itibariyle en basit vitaminlerden biridir. Bir şeker asidinin laktonundan ibarettir. Çoğu yüksek hayvanlar ve bitkiler askorbik asidi glukozdan ve diğer basit ön basamaklardan sentezleyebilirler. Mikroorganizmalarda askorbik asit yoktur. İnsan dahil bazı omurgalıların gıdalarında muhakkak alınması gereklidir.

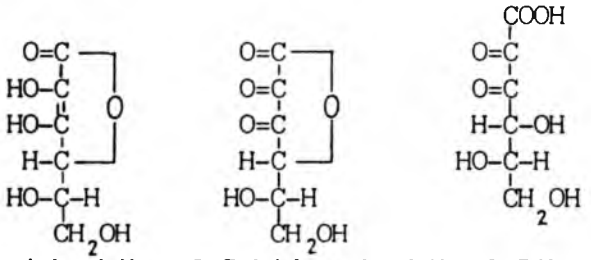
Askorbik asit, kolayca hidrojen atomu veren ve bu sırada dehidroaskorbik aside dönüşen kuvvetli bir indirgeyici ajandır. Dehidroaskorbik asit te vitamin etkisine sahiptir. Bu aktivite, dehidroaskorbik asidin lakton halkasının diketogulonik aside hidroliziyle kaybolur (Şekil 9.15). Besinlerin ısıtılması sırasında askorbik asit geniş ölçüde bozulur.

Diğer suda çözünen vitaminlere kıyasen askorbik asit, hayvansal ve bitkisel dokularda oldukça yüksek konsantrasyonda mevcuttur. İnsan kan plazması 100 ml'de 1 mg kadar askorbik asit ihtiva eder. Narenciye ve domates askorbik asitçe oldukça zengindir.

Dokularda askorbik asit konsantrasyonu nisbeten fazla olmasına ve nisbeten basit yapısına rağmen, vitamin olarak esas önemi henüz bilinmemektedir. Kofaktör olarak, prolinin hidroksiproline enzimatik hidroksilasyonu ve diğer hidroksilasyon reaksiyonlarına katılır; bununla birlikte bu reaksiyonlar için hiçbir spesifitesi yoktur ve antiskorbit özellikte olmayan diğer redüksiyon vasıtalarıyla değiştirilebilir.

C vitamini kapilar duvarlarının geçirgenliğini azaltır. Eksikliğinde deride kanamalar meydana gelir; de-

vam ederse skorbüt adı verilen bir eksiklik hastalığı meydana gelir. Bu hastalıkta diş etlerinde şiddetli kanamalar olur.



L-Askorbik asit | L-Dehidroaskorbik asit | L-Diketogulonik asit

Şekil 9.15. Askorbik asit ve türevleri.

9.1.k. Suda Çözünen Diğer Büyüme Faktörleri

Şimdiye kadar anlatılan suda çözünen vitaminler dışında, bazı türler için belirli şartlar altında esensiyal besinlerden sayılan bazı faktörler vardır. Siklik şeker alkolü olan miyo-inositol fareler de normal saç büyümesi için zaruridir (Şekil 9.16). Büyük fareler garip tarzda inositolü glukozdan sentezleyebilirler, bununlar birlikte bu miktar da kafi gelmez. İnositolün bir koenzimin yapı taşı olduğu bilinmemektedir; ancak hayvansal dokularda inositol-fosfogliseridin bileşeni olarak büyük miktarda bulunur.

Kolin de, kolin-fosfogliseridlerin bileşenidir (Şekil 9.16). Bilinen bir koenzim fonksiyonu olmamasına rağmen, büyük farelerin gıdaları için gereklidir. Kolin eksikliği karaciğer yağlanmasına ve böbrek kanamasına yol açar.

miyo-İnositol | Kolin

Şekil 9.16. Bazı büyüme faktörleri.

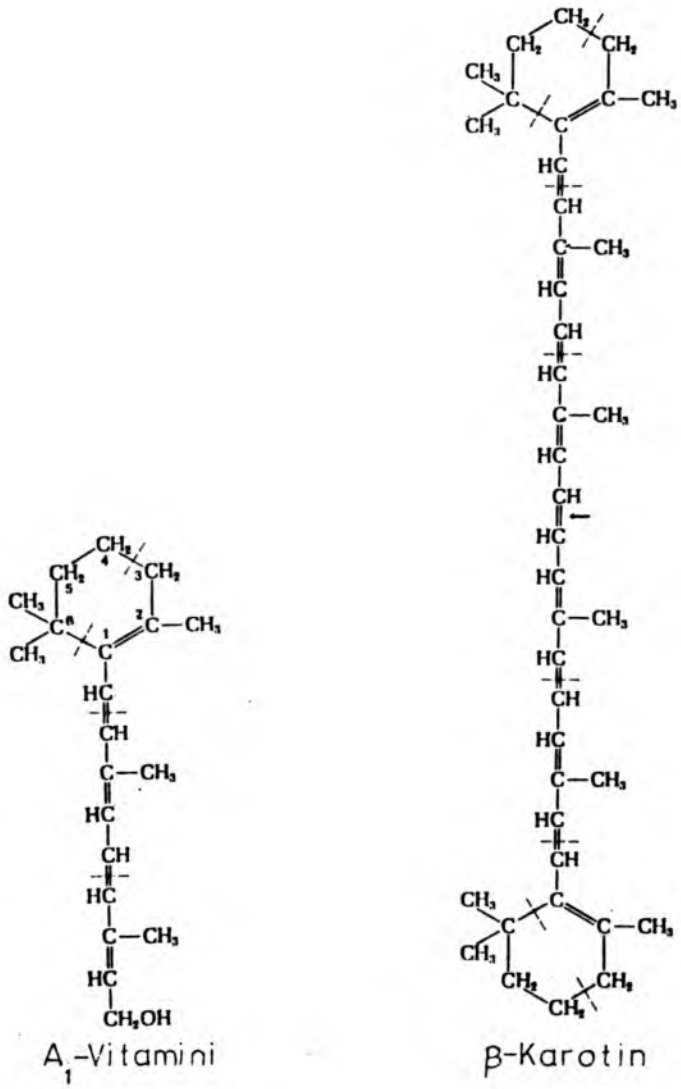
9.2. YAĞDA ÇÖZÜNEN VİTAMİNLER

Yağda çözünen dört vitamin olan A, D, E ve K vitaminlerinin hepsi izopren birimlerinden meydana gelmişlerdir. Üzerlerinde çok yoğun araştırmalar yapılmasına ve insan besininde çok yaygın bulunmasına rağmen, spesifik biyolojik fonksiyonları üzerine suda çözünen vitaminlere göre daha az şey bilinmektedir. Şimdiye kadar yağda çözünen vitaminlerin hiçbirisi için spesifik bir koenzim fonksiyonu bulunmamıştır ve sadece A ve D vitaminlerinin etki tarzlarının moleküler temellerine nüfüz edilmiştir.

9.2.a. A Vitamini

A vitamini tabiatta iki yaygın şekliyle mevcuttur: memeli dokularında ve deniz suyu balıklarında bulunan A_1 vitamini veya retinol, tatlı su balıklarında bulunan A_2 vitamini veya retinol$_2$ (Şekil 9.17). Her ikisi altı üyeli bir karbon halkası ve 11 karbonlu bir yan zincirden ibarettir. Memelilerde sadece retinol, A vitamini aktivitesi göstermez; aynı zamanda bitkilerde çok yaygın olan belirli karotinoidler (özellikle α-, β- ve γ-karotin) de A vitamini aktivitesi gösterir. Bu karotinoidler bağırsak zarında ve karaciğerdeki enzimatik reaksiyonlarla A vitaminine dönüşürler. Simetrik bir yapıya sahip olan β-karotin ortadan bölünür ve iki molekül retinol meydana gelir. Retinol, memeli hayvan dokularında mevcuttur ve kanda uzun zincirli yağ asiti esteri şeklinde taşınır.

A vitamini eksikliği genç hayvanlarda, büyüme geriliğine, kemik ve sinir sisteminin doğru gelişmemesine götürür, deri kurur ve kalınlaşır, böbrekler ve değişik bezler dejenere olur ve kısırlık görülür. A vitamini eksikliğinden en fazla etkilenen gözlerdir. Genç hayvanlar ve küçük çocuklarda vitamin eksikliğinin erken belirtisi olarak kseroftalmi diye bilinen hastalık ortaya çıkar ve bu bazı tropikal bölgelerde körlüğe götürür. Yetişkinlerde A vitamini eksikliği gece körlüğü şeklinde tezahür eder. Gece körlüğü, karanlığa adapte olamama durumudur.

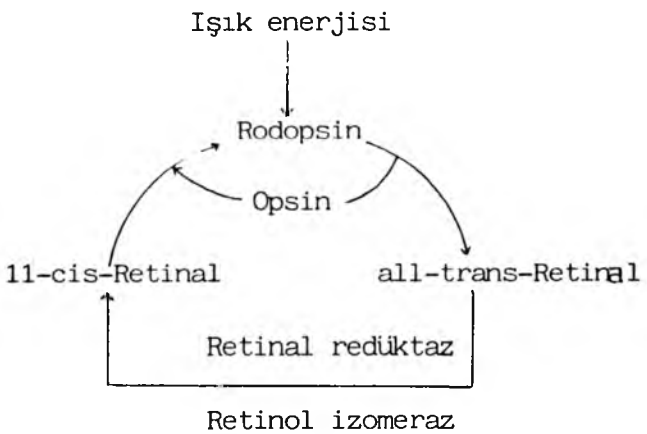


Şekil 9.17. A_1 vitamini (retinol) ve ön maddesi olan β-karotin. A_2 vitamini halkanın 3 ve 4 nolu karbon atomları arasında ek bir çift bağa sahiptir.

İnsanın günlük A vitamini ihtiyacı bir miligramın altındadır; bu ihtiyaç büyük oranda salata, ıspanak, patates gibi yeşil ve sarı bitkisel gıdalarla karşılanır. Bunların hepsi de karotince zengindirler. A vitamininin

fazla alınması toksikdir ve çocuklarda kolay kırılan kemiklere götürür.

A vitaminin genel biyolojik fonksiyonu bilinmemesine rağmen, omurgalıların görme olayındaki rolü hakkında sağlam bilgiler vardır. Bu olaylar şöyle açıklanabilir: (1) Retinada fotoreseptör hücrelerin bir pigmenti vasıtasıyla ışık enerjisi absorblanır, bu sırada bir fotokimyasal ürün meydana gelir, (2) Bu foto ürün vasıtasıyla bir sinir impulsu ortaya çıkar ve (3) Görme renk maddesi ışığa hassas şekline tekrar döner (Şekil 9.18).

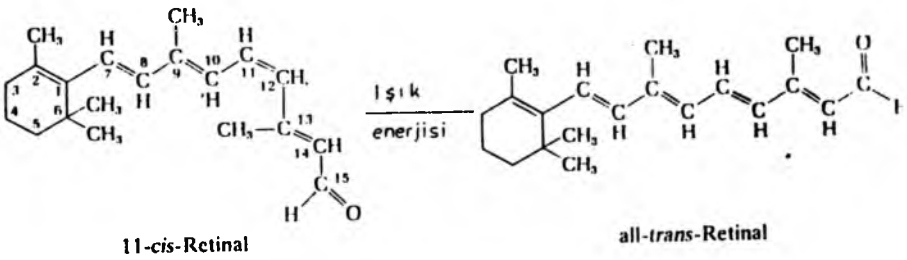


Şekil 9.18. Çubuğumsu hücrelerde siklik görme olayının şeması.

Diğer memeli hayvanlarda olduğu gibi insanın ağ tabakası da ışığı hassas iki farklı fotoreseptör hücre ihtiva eder; çubukçuklar zayıf ışık şiddetini algılamaya uygun durumdadırlar, ancak hiçbir rengi tanımazlar. Bu hücreler gece görmekten sorumludurlar; A vitamini eksikliğinden etkilenirler. Buna karşılık tıpa şeklinde olanlar rengi algılarlar ve kuvvetli ışığa adapte olurlar.

Ağ tabakanın çubuğumsu hücreleri birbiri üzerine kümelenmiş disk şeklinde membran veziküllerine sahiptir-

ler. Bunlar retinanın ışığa hassas yüzeyinde paralel sıralanmışlardır ve ışık reseptör fonksiyonu yapmaktadırlar. Bu veziküllerin membran proteinlerinin yaklaşık yarısı ışık absorblayan konjuge olmuş rodopsin proteininden (M.A. 28.000) ibarettir. Rodopsin suda çözünmez, fakat deterjanlarla veziküllerden ekstrakte edilebilir. Saflaştırılmış rodopsinin absorbsiyon spektrumu, görünür bölgede alaca karanlıktaki gözün ışık hassasiyet eğrisiyle uygunluk gösterir; bu, rodopsinin çubuğumsu hücrelerde en önemli ışık reseptörü olduğunu gösterir. Rodopsin, opsin adlı bir protein ve ona çok sıkı bağlı A vitaminin aldehidi olan 11-cis retinalden meydana gelmiştir. 11-cis-Retinal, yan zincirinde dört C-C çift bağı taşır; bunların üçü trans formda, 11-12 pozisyonundaki ise cis-formundadır (Şekil 9.19). Bu reaksiyonlar enzimatik olarak yürümez; sıvı azotun sıcaklığında bile yürüyen tam bir fotometrik reaksiyondur. Retinalin izomerizasyonu başka moleküler değişikliklere göre yürür, sonunda beyazlanmış rodopsinin disosiasyonuyla sonuçlanır; bu serbest opsin ve all-trans-retinalin oluşumuna götürür, böylece sinir impulsları uyandırılır.



11-*cis*-Retinal

all-*trans*-Retinal

Şekil 9.19. 11-cis Retinalin ışıkta indüklenen izomerizasyonu.

Rodopsinin opsin ve all-trans-retinalden rejenere edilmesi için, tekrar 11-cis-retinale izomerize edilmelidir. Bu, iki enzimin katalizlediği reaksiyonlarla vuku bulmaktadır:

$$\text{all-trans-Retinal} + NADH + H^{+} \xrightarrow[\text{redüktaz}]{\text{Retinal}} \text{all-trans-Retinol} + NAD^{+}$$

$$\text{all-trans-Retinol} \xrightarrow[\text{izomeraz}]{\text{Retinol}} \text{11-cis-Retinol}$$

$$\text{11-cis-Retinol} + NAD^{+} \xrightarrow[\text{redüktaz}]{\text{Retinal}} \text{11-cis-Retinal} + NADH + H^{+}$$

Böylece oluşan 11-cis-retinal tekrar opsinle birleşerek rodopsini meydana getirir.

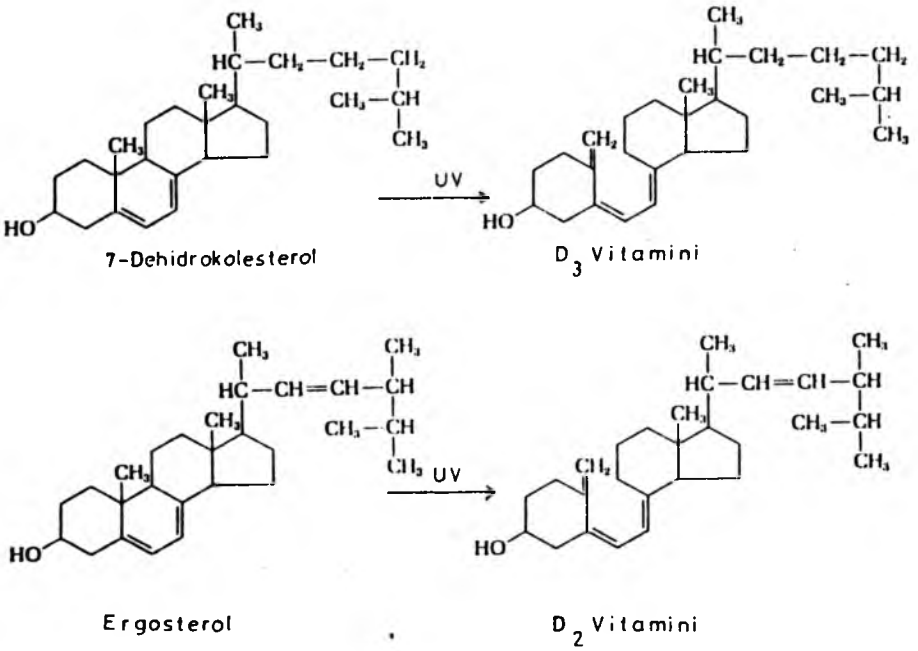
Görme olayının son kısmında, ağ tabakada rodopsin molekülünün beyazlanması vasıtasıyla sinir impulsu oluşur ve bu da beyinde özel ışık olarak algılanır. Yeni araştırmalar, disk şeklinde düzleşmiş membran veziküllerinde ışık absorbsiyonu vasıtasıyla rodopsinin bir konformasyon değişikliğinin meydana geldiğini ve bu değişiklik sonucu 11-cis-retinal all-trans şekline dönüştüğünü göstermiştir. Bu, bir potansiyel farkına yol açan vezikül membranlarında geçirgenlik değişikliğine sebep olur ve böylece Ca^{+2} iyonları veziküllerden çıkarak sinir impulsları oluşturabilir. Ca^{+2} , reseptör sistemle uyandırıcıyı bağlama görevini üstlenir.

A vitamini eksikliği bir memeli organizmasının bütün dokularını etkilediği için, A vitamininin bütün etkisi sadece retinada değildir. A vitamininin Ca^{+2} iyonlarının belirli membranlar arasından transportunda önemli rol oynaması mümkün gözükmektedir.

9.2.b. D Vitamini

D vitamini etkisi gösteren on kadar farklı bileşik bilinmektedir. D vitaminlerine kalsiferoller de denir. En önemli olanları D_2vitamini (ergokalsiferol) ve D_3 vitamini (kolekalsiferol)'dir. Bu bileşikler B-halkası açılmış steroidler olarak düşünülebilir. D_2 vitamininin ön madde-

si (provitamini) mayada bulunan ergosterol ve D_3 vitamininin ön maddesi hayvansal dokularda bulunan 7-dehidrokolesteroldur. Steran halka sistemini ihtiva eden bu provitaminler, ultraviyole ışınların etkisiyle B halkasının açılmasıyla birlikte vitamin türevlerine dönüşürler (Şekil 9.20). Bu sonuçlara göre bugün insanlarda kolekalsiferolün tabii ön maddesinin deride bulunan 7-dehidrokolesterol olduğu bilinmektedir. Bu dönüşüm için derinin güneş ışığıyla ışınlanması gereklidir.



Şekil 9.20. D vitaminlerininprovitaminlerden oluşumu.

Yetişkin bir insanın D vitamini ihtiyacı günlük yaklaşık 20 µg'dır. D vitamini, karaciğerde yeteri kadar depolanabilir ve haftalarca kullanılabilir. A vitamininde olduğu gibi, D vitaminin de aşırı alınmasında kemik iskeletinin kırılabilirliği artar; bu gözlemler her iki vitaminin kalsiyumum biyolojik transportunda ve depolanmasında rol oynadığını göstermektedir.

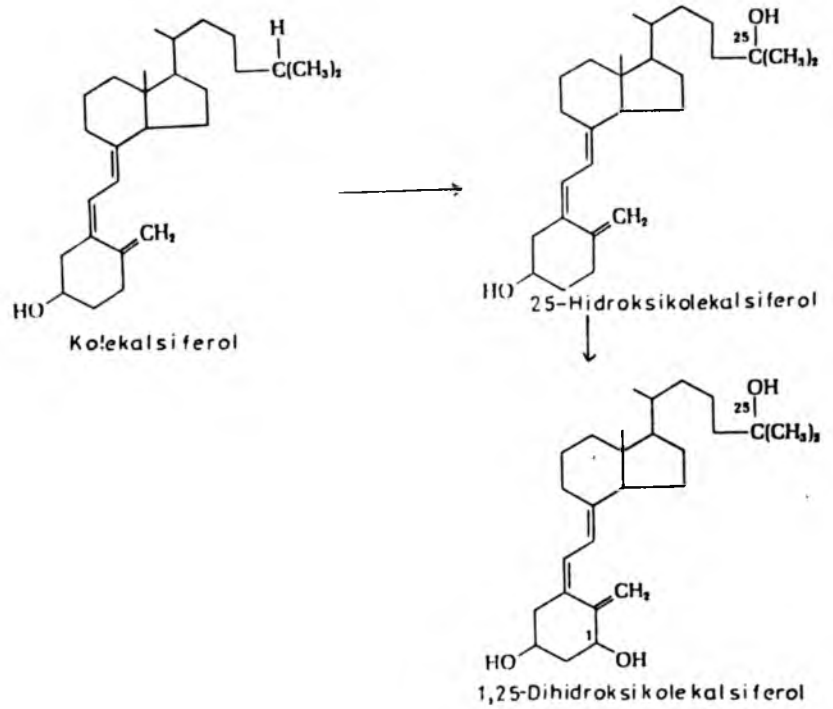
D vitaminleri, kalsiyum ve fosfat iyonlarının ince bağırsaklardan emilmesini hızlandırırlar. Kolekalsiferol bu etkiyi organizmada bazı değişikliklere uğradıktan sonra gösterir. Önce kolekalsiferol, karaciğerde daha aktif bir madde olan 25-hidroksikolekalsiferole ve bu da böbreklerde çok daha aktif olan 1,25-dihidroksikolekalsiferole dönüşür (Şekil 9.21). Daha sonra bu da kan yolu ile gittiği bağırsak mukozası hücrelerine etki ederek kalsiyum iyonlarının emilmesini kolaylaştırır. Bu sırada fosfat iyonlarının emilmesi de kendiliğinden artar. Ca^{+2} iyonlarının emilmesi, bağırsak mukozasında sentez edilen ve bu iyonun taşıyıcısı olan özel bir protein tarafından kolaylaştırılır. 1,25-Dihidroksikolekalsiferolün rolü parathormonun etkisiyle sınırlandırılır. Ca^{+2} konsantrasyonu normalın altına düşerse, paratiroid bezinden parathormon salgılanır. Bu hormon böbreğe etki ederek 1,25-dihidroksikolekalsiferol oluşumunu uyarır. Organizmaya yeteri kadar kalsiyum alınmazsa, 1,25-dihidroksikolekalsiferolün kemiklerden kalsiyum ve fosfat iyonlarının mobilizasyonunu hızlandırma etkisi de görülür.

Böbreklerde oluşan ve buradan kan yolu ile bağırsaklara ve kemiklere giderek etki gösteren 1,25-dihidroksikolekalsiferolün bir hormon olduğu ileri sürülmektedir. Ancak hormondan farkı ön maddesi olan D_3 vitamininin dışarıdan da alınabilmesidir.

D vitaminleri, en çok balıkların karaciğer yağlarında, bundan başka az miktarda yumurta sarısı, süt ve tereyağında bulunur. D_2 provitamini olan ergosterol mantar ve mayalarda, D_3 provitamini olan 7-dehidrokolesterol ise cilt altındaki yağda bulunmaktadır.

9.2.c. E Vitamini

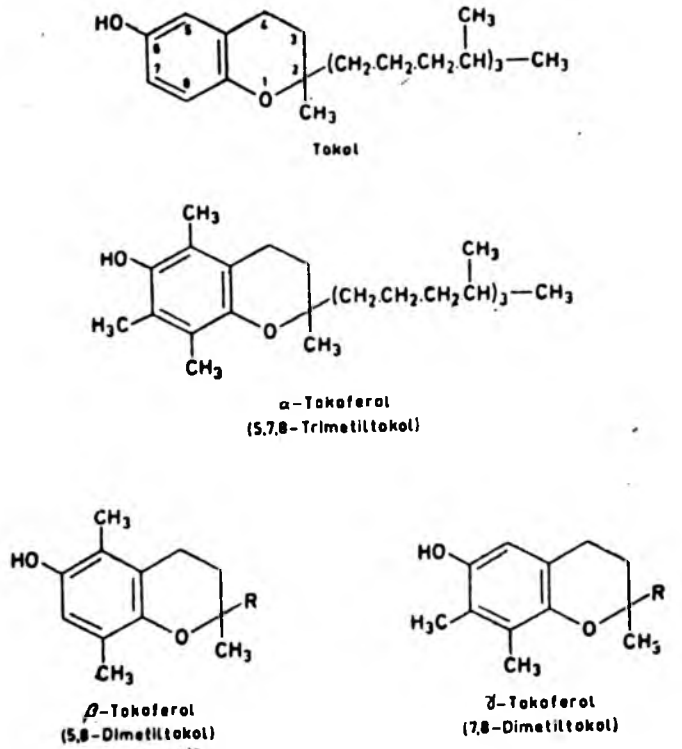
E vitamini etkisi gösteren sekiz bileşik bilinmektedir. Bu bileşikler α-, β-, γ-, δ-, ε- vb. tokoferoller olarak adlandırılır. Tokoferoller içinde en bol bulunan ve en aktif olanı α-tokoferoldür.



Şekil 9.21. Kolekalsiferolün (D_3 vitamini) 25-hidroksikolekalsiferol ve daha sonra 1,25-dihidroksikolekalsiferole dönüşümü.

Tokoferoller bir kroman halka sistemi ve izoprenoid bir yan zincir ihtiva ederler. Kroman halka sistemi, bir benzen halkası ile bir piran halkasının kondansasyonundan meydana gelir. 2-Metil-2-fitil-6-hidroksi kromana tokol denir. Bütün tokoferoller tokol türevleridir (Şekil 9.22).

Tokoferollerin biyolojik fonksiyonları henüz açık değildir. Erkek ve dişi sıçanlarda kısırlık dışında bu vitaminin noksanlığı bir seri başka belirtilere sebep olur; böbreklerin dejenerasyonu, lipid depolanan yerlerde kahverengi bir pigmentin birikmesi, karaciğer nekrozu ve distrofisi gibi. Tokoferol eksikliğinin insanda kısırlığa sebep olup olmadığı bilinmemektedir.



Şekil 9.22. Tokol ve bazı türevleri.

Tokoferoller antioksidan olarak bilinirler. Böylece moleküler oksijene maruz bırakıldığında doymamış yağ asitlerinin oksidasyonunu çok azaltabilirler. Bu gibi oksidasyonlar doymamış yağ asitlerinin polimerleşmesine sebep olur. Gerçekten hayvanlarda tokoferol eksikliğinin bazı belirtileri, antioksidan özellikli bazı bileşiklerle de giderilebilir. Buna göre tokoferollerin fonksiyonlarından birisi biyolojik membranların lipidlerindeki birçok doymamış yağ asitlerini moleküler oksijenin bozucu etkisine karşı korumaktır. Normal olarak dokularda doymamış yağların hiçbir oksidasyon ürünü görülmez; bununla birlikte tokoferol eksikliğinde bu durum yağ depo yerlerinde görülebilir. Koenzim Q ve bazı türevlerinin de tokoferollere benzer özellikleri vardır.

Tokoferoller en çok buğday tanesi yağında bulunurlar.

9.2.d. K Vitamini

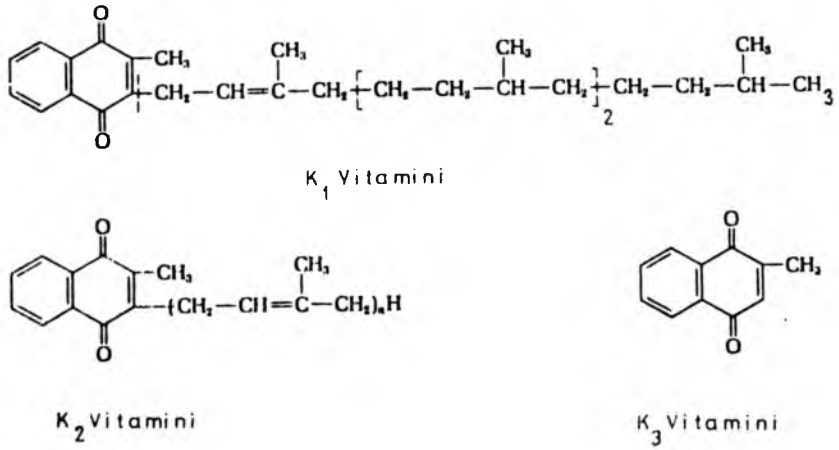
Naftokinon halkası ihtiva eden K vitamininin etkisini gösteren doğal ve sentetik birçok bileşikler vardır. K_1 ve K_2vitamini şeklinde gösterilen iki doğal K vitamini bilinmektedir. K_2 vitamini aktif şekil olarak görünmektedir. Sentetik K vitamini olan K_3 vitamini (diğer adıyla menadion) uzun yan zincir ihtiva etmez (Şekil 9.23).

Sıçanlarda ve diğer memelilerde K vitamini eksikliği pek güç tesbit edilebilir. Çünkü bu vitamin söz konusu canlıların bağırsak bakterilerince sentezlenebilir. K vitamini eksikliğinin bilinen tek sonucu, karaciğerde prokonvertin enziminin biyosentezinin vuku bulmamasıdır. Bu enzim, protrombin oluşumunda cereyan eden kompleks reaksiyon serisinde bir basamağı kataliz eder. Protrombin trombinin ön maddesidir. Trombin de, kan pıhtısının fibriler kısmını oluşturan fibrinin, fibrinojenden hızlıca oluşumunu sağlar. K vitaminine benzer bir bileşik olan dikumarol (Şekil 9.24), hayvanlarda K vitamini eksikliğinde görülen duruma benzer belirti gösterir; bunun K vitamininin etkinliğini bloke ettiği tahmin edilmektedir. Klinikte dikumarol pıhtılaşmanın azaltılması için kullanılmaktadır.

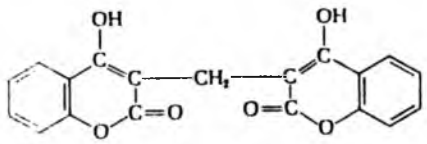
K vitamini birçok mikroorganizmalar ve çoğu bitkiler tarafından sentezlenebildiği ve bütün organizmaların dokularında bulunduğu için, kan pıhtılaşmasının yanında başka genel bir görevi olup olmadığı sorusu ortaya çıkmaktadır. Bazı sonuçlar hayvansal dokularda belirli bir elektron transport yolunda koenzim fonksiyonu yaptığını göstermektedir; K vitamini hidrokinona dönüşümlü indirgenebilen bir kinon olduğu için, elektron taşıyıcısı görevini üstlenmesi mümkün gözükmektedir.

K_1ve K_2vitaminleri bitkilerde bulunur. K_1 vitamini özellikle ıspanak, kaba yonca gibi yeşil yapraklarda bulunur. Ayrıca lahana, karnıbahar, domates, soya fasulyesi, pirinç kepeği ve yulaf filizlerinde de bulunur. K_2

vitamini aynı zamanda bağırsak bakterilerinin bir metabolizma ürünüdür.



Şekil 9.23. K vitaminleri.



Şekil 9.24. K vitamininin antagonisti olan dikumarol ((3,3'-metilenbis)-(4-hidroksi-1,2-benzopiron)).

10.BÖLÜM: METABOLİZMA VE BİYOENERJETİK

Şimdiye kadar canlı organizmalarda bulunan biyomolekülleri inceledik. Şimdi sıra biyokimyanın en önemli iki sorusunu cevaplandırmağa gelmiştir:

1) Hücreler çevrelerinden enerji ve indirgeyici gücü nasıl elde ederler?

2) Hücreler kendi makromoleküllerinin yapı taşlarını nasıl sentezlerler?

İşte bu iki sorunun cevabını teşkil eden olaylar son derece karmaşık bir kimyasal reaksiyon ağı tarafından gerçekleştirilir. Bu ağda yer alan reaksiyonların tümüne birden metabolizma adı verilir.

E.coli gibi basit bir organizmada bile bin civarında kimyasal reaksiyon vuku bulmaktadır. Yüksek canlı yapılarını gözönüne aldığımızda biyokimyasal reaksiyonların sayısı büyük bir rakama ulaşır. Bununla beraber, bu reaksiyon kalabalıklığının yanısıra reaksiyon çeşitlerinin o derece çok olmadığı görülür. Bu reaksiyonların mekanizmaları da oldukça basittir. Meselâ, bir çift bağ umumiyetle dehidratasyon yoluyla teşekkül eder. Bütün organizma çeşitlerinde yalnız yüz civarında molekül anahtar rolü oynar. Metabolik yollar müşterek tarzda düzenlenirler.

Bu bölümde, metabolizmanın genel prensiplerini ve motiflerini, biyoenerjetik adı verilen ve canlı organizmalardaki enerji dönüşümlerini kapsayan temel ilkelerle beraber ele alacağız. Önce hücre hayatı için gerekli olan karbon ve enerji kaynakları ile ilgili bir sınıflandırma yaptıktan sonra,karbon ve azot devirlerini izah edeceğiz.

10.1. HÜCRELERİN KARBON VE ENERJİ KAYNAKLARI

Hücreler, çevreden temin ettikleri karbonun kimyasal şekline göre iki büyük sınıfa ayrılırlar: ototroflar ve heterotroflar. Ototrof hücreler karbon kaynağı olarak

yalnız CO_2'yi kullanırlar ve karbon ihtiva eden bütün biyomolekülleri CO_2'den sentezlerler. Heterotrof hücreler ise, CO_2'yi kullanamazlar ve çevrelerinden karbonu glukoz gibi nisbeten kompleks ve indirgenmiş şekilde temin ederler. Ototrof hücreler kendi kendilerine yeterli hücrelerdir. Fakat heterotroflar başka hücrelere bağımlıdır. Fotosentetik hücrelerle bazı bakteriler ototrof, yüksek hayvan hücreleri ile mikroorganizmaların çoğu heterotroftur.

Hücreler enerji kaynaklarına göre de tasnif edilebilirler. Enerji kaynağı olarak ışığı kullanan hücrelere fototrof, indirgenme-yükseltgenme reaksiyonlarını kullananlara da kemotrof hücreler adı verilir. Kemotroflar, enerji elde etmek için yükseltgedikleri (oksitledikleri) elektron vericilerinin tabiatına göre de ikiye ayrılırlar: Elektron vericisi olarak glukoz gibi kompleks organik bileşiklere ihtiyaç duyan kemotroflara kemoorganotroflar, H_2, H_2S, NH_3 veya S gibi basit inorganik elektron vericileri kullananlara da kemolitotroflar denilir. Tablo 10.1'de bütün hücrelerin enerji ve karbon kaynaklarına göre, fotolitotrof, fotoorganotrof, kemolitotrof ve kemoorganotrof grupları altında tasnifleri yapılmıştır.

Organizmaların büyük çoğunluğu fotolitotrof veya kemoorganotroftur; diğer iki grupta nisbeten çok az sayıda tür vardır. Fakat kemolitotrof grubundaki organizmalardan moleküler azotun fiksasyonunu veya amonyağın nitratlara oksitlenmesini sağlayan toprak mikroorganizmalarının canlı kürede çok önemli rolleri vardır. Bu arada yeryüzündeki canlıların hemen hemen yarısının mikroorganizmalardan ibaret olduğunu ve bunların büyük bir çoğunluğunun toprak ve denizlerde yaşadığını hatırlamakta fayda vardır.

Hetorotroflar, aynı zamanda aerobik ve anaerobik hücreler şeklinde de tasnif edilebilir. Aerobik hücreler organik bileşikler tarafından verilen elektronların son alıcısı olarak oksijen kullanan, anaerobik hücreler ise

elektron alıcısı olarak oksijen dışında bir bileşik kullanan organizmalardır. Birçok hücreler hem aerobik hem de anaerobik halde yaşayabilirler. Bunlara fakültatif organizmalar adı verilir. Heterotrofik hücrelerden çoğu, bilhassa yüksek organizmaların hücreleri fakültatiftir.

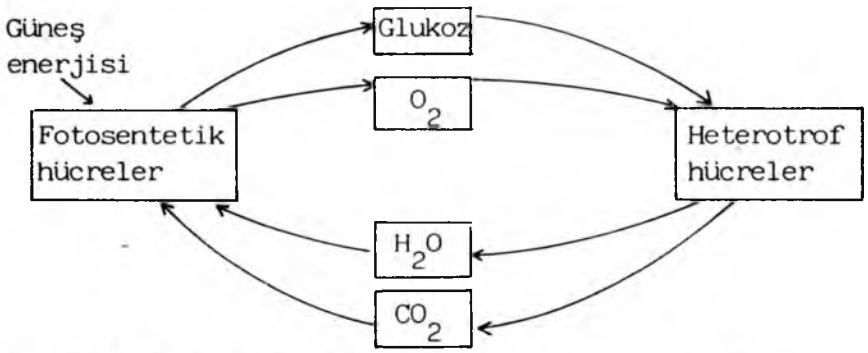
Tablo 10.1. Organizmaların karbon ve enerji kaynaklarına göre tasnifi.

Organizma tipi	Karbon kaynağı	Enerji kaynağı	Elektron vericisi	Örnek
1. Fotolitotroflar	CO_2	Işık	İnorganik bileşikler (H_2O,H_2S,S)	Yüksek bitkilerin hücreleri, mavi yeşil algler, fotosentetik bakteriler.
2. Fotoorganotroflar	Organik bileşikler	Işık	Organik bileşikler	Nonsülfür mor bakteriler.
3. Kemolitotroflar	CO_2	Redoks reaksiyonları	İnorganik bileşikler (H_2,S,H_2S, NH_3)	Hidrojen, kükürt, demir ve denitrifiye bakteriler.
4. Kemoorganotroflar	Organik bileşikler	Redoks reaksiyonları	Organik bileşikler (glukoz)	Bütün yüksek hayvanlar, çoğu mikroorganizmalar ve fotosentetik olmayan bitki hücreleri.

Herhangi bir canlı organizmanın bütün hücreleri aynı sınıftan olmayabilir. Meselâ, yüksek bitkilerin klorofil ihtiva eden yaprakları fotosentetik ototrof iken, kök hücreleri heterotroftur. Aynı zamanda yeşil yaprak hücrelerinin çoğu gün ışığında ototrof olarak davranırken, karanlıkta heterotroftur.

10.2. KARBON VE AZOT DEVRİ

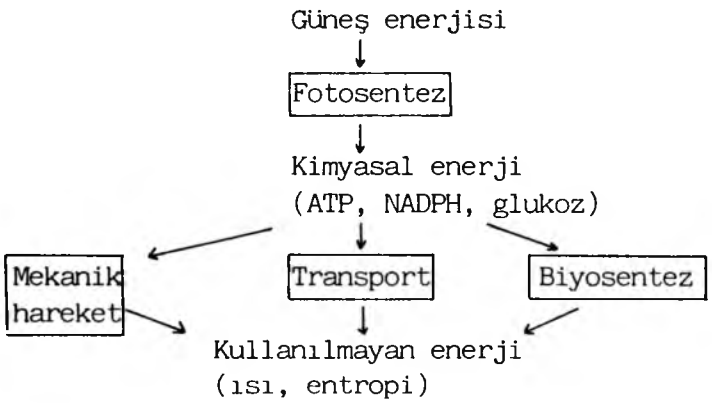
Tabiattaki canlı organizmalar beslenme yönünden birbirlerine bağımlıdırlar. Eğer canlı küreyi geniş manada ele alırsak, fotosentetik ve heterotrof hücrelerin birbirlerini besledikleri müşahede edilir. Fotosentetik hücreler atmosferdeki CO_2'den glukoz gibi organik bileşikler sentezlerken, dışarıya O_2 verir. Heterotrof hücreler ise, bu glukoz ve O_2'yi kullanarak atmosfere CO_2 bırakır (Şekil 10.1). Biyosferdeki karbon devri, bir enerji akımıyla beraberce seyreder. Fotosentez esnasında güneş enerjisi (solar enerji), glukoz ve diğer indirgenmiş ürünlerdeki kimyasal enerjiye dönüştürülür. Bu bileşikler de heterotroflar tarafından enerji isteyen aktivitelerinde kullanılır (Şekil 10.2).



Şekil 10.1. Biyosferdeki karbon ve oksijen devri.

Biyolojik enerji akımı büyük miktarlarda enerjiyi gerektirmektedir. Yılda yaklaşık 10^{22} kalorilik güneş e-

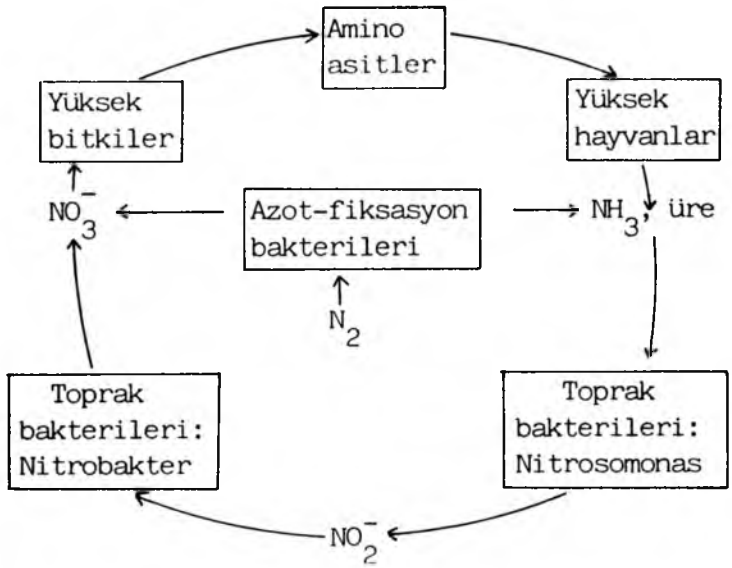
nerjisi fotosentez hücreleri tarafından alınmakta ve bununla $3,5x10^{11}$ ton karbon indirgenerek hetorotroflara enerji ve biyomolekül yapı taşı kaynağı olarak verilmektedir.



Şekil 10.2. Biyosferdeki enerji akımı.

Protein ve nükleik asitlerin yapısında bulunan azot da, canlılar arasında devredilen önemli bir elementtir. Azot molekülü (N_2), atmosferde çok bol miktarda bulunmasına rağmen kimyasal yönden inert olduğundan canlı organizmalar tarafından doğrudan doğruya kullanılamaz. Ancak NO_3^-, NH_3 veya amino asitlere dönüştürülmesi gerekmektedir. Bununla beraber bu bileşikler su yüzeyinde ve toprakta oldukça az bulunurlar ve devamlı olarak devredilirler. Azot devrinde (Şekil 10.3) bitkiler azotu topraktan NO_3^- halinde alırlar ve NH_3, amino asitler ve diğer indirgenmiş bileşiklere redüklerler. Bunlar hayvanlar tarafından kullanıldıktan sonra, yine indirgenmiş halde toprağa bırakılırlar. Toprak mikroorganizmaları daha sonra NH_3'ü NO_2^- ve NO_3^-'e oksitlerler. Azot fiksasyonunu gerçekleştiren bakteriler de atmosferik N_2'yi indirgeyerek, onu faydalanılabilecek şekle sokarlar.

Kendi kendine en yeterli hücreler azot fiksasyonu yapabilen ve toprak, temiz su veya okyanuslarda bulunan mavi-yeşil alglerdir. Bu organizmalar enerjilerini güneşten, karbonlarını CO_2'den ve CO_2'nin indirgenmesi için elektronlarını da sudan alırlar.



Şekil 10.3. Azot devri.

10.3. SERBEST ENERJİ

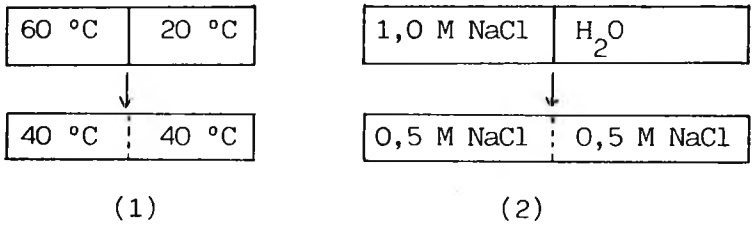
Metabolizma olaylarındaki enerji dönüşümlerini daha iyi anlamak için, bazı termodinamik prensipleri kısaca gözden geçirmek faydalı olacaktır.

Termodinamikte, incelenmekte olan madde topluluğuna sistem, sistemin haricindeki herşeye çevre adı verilir. Termodinamiğin birinci kanununa göre, bir sistem ve çevresinin toplam enerjileri sabittir. Diğer bir deyimle enerji korunur. Birinci kanunun matematik yoldan ifadesi,

$$\triangle E = E_B - E_A = q - w$$

şeklindedir. Burada E_A, sistemin başlangıçtaki, E_B ise değişme sonundaki enerjisidir. q, sistem tarafından absorbe edilen ısı, w da sistem tarafından yapılan iştir. Bu ifadenin önemli bir yönü de, bir sistemin enerjisindeki değişmenin ilk ve son hallerine bağlı olup, dönüşümün gerçekleştiği yol ile değişmemesidir.

Termodinamiğin birinci kanunu ile bir reaksiyonun kendiliğinden olup olamayacağı tahmin edilemez. ΔE pozitif olduğu halde bazı reaksiyonlar kendiliğinden vuku bulur. Böyle durumlarda sistem çevreden ısı alır ve çevrenin toplam enerjileri yine sabit kalır. Bu durumda ΔE'den farklı bir fonksiyona ihtiyaç vardır. Entropi (S), bu işte faydalanılacak fonksiyonlardan birisidir ve bir sistemin düzensizlik derecesinin bir ölçüsü olarak tarif edilir. Bir sistem daha düzensiz bir hale geçtiğinde entropisi artar ve ΔS pozitif olur. Termodinamiğin ikinci kanununa göre bir olay, ancak ve ancak sistem ve çevre entropilerinin toplamı arttığı zaman, kendiliğinden cereyan eder (Şekil 10.4). Yani kendiliğinden yürüyen bir olay için $(\Delta S_{sis.} + \Delta S_{çevre}) > 0$'dır. Burada dikkat edilecek nokta, kendiliğinden yürüyen bir olayda sistemin entropisi azalabilir, fakat bu durumda çevrenin entropisi $(\Delta S_{sistem} + \Delta S_{çevre}) > 0$ olacak kadar artmalıdır. Meselâ son derece düzenli bir yapıya sahip biyolojik birimler termodinamik yönden şöyle mümkün olabilmektedir: Bu düzenli yapıdan dolayı sistemin entropisi azalmaktadır, fakat çevresindeki entropi artışı bu azalmadan daha fazla olduğu için toplamları pozitif bir netice verir.



Şekil 10.4. Sistem entropisinin artışıyla yürüyen olaylara iki örnek: (1) Isı difüzyonu ve (2) Çözünen difüzyonu.

Bir biyokimyasal olayın kendiliğinden olup olamıyacağının bir ölçüsü olarak entropinin kullanılmasındaki en önemli zorluk kimyasal reaksiyonlardaki entropi değişmelerinin kolayca ölçülememesidir. Sistemden başka çevre-

sindeki değişimin de gerekmesi zorluğu artırmaktadır. Bu zorluklar yeni bir fonksiyonun ortaya atılmasıyla aşılmıştır: serbest enerji. G sembolüyle gösterilen serbest enerji, 1878 yılında J. Willard Gibbs tarafından termodinamiğin birinci ve ikinci kanunlarının birleştirilmesi ile elde edilmiştir. Bu fonksiyonun temel denklemi

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

olup, burada ΔG, değişime maruz kalan sistemin sabit basınç (P) ve sıcaklıktaki (T) serbest enerji değişimi; ΔH, sistemin entalpisindeki değişim ve ΔS de sistemin entropisindeki değişimdir. Görüldüğü gibi bu denklemde çevrenin özellikleri yer almamaktadır. Entalpi değişimi,

$$\Delta H = \Delta E + P\Delta V$$

ile verilir. Biyokimyasal reaksiyonların hepsinde hacim değişimi (ΔV), çok küçük olacağından $\Delta H \cong \Delta E$ alınabilir. Buradan da

$$\Delta G \cong \Delta E - T\Delta S$$

yazılabilir. Sonuç olarak, bir reaksiyonun ΔG değeri sistemin iç enerjisi ve entropisindeki değişime bağlıdır.

Bir reaksiyonun serbest enerjisindeki değişme (ΔG), iç enerji değişiminin (ΔE) aksine, bir reaksiyonun kendiliğinden yürüyüp yürüyemiyeceğinin önemli bir kriteri olarak kullanılabilir.

1. Ancak ve ancak $\Delta G < 0$ ise, bir reaksiyon kendiliğinden vuku bulur.
2. $\Delta G = 0$ ise, sistem dengede olup, hiç bir net değişme olmaz.
3. $\Delta G > 0$ ise, bir reaksiyon kendiliğinden vuku bulmaz. Bu reaksiyonun belirtilen yönde yürütülmesi için dışarıdan serbest enerji verilmesi gerekir.

Bir reaksiyonun ΔG değeri, ürünlerin serbest enerjisi ile (son hal), reaktantların serbest enerjilerinin (ilk hal) arasındaki farka eşittir ve değişimin vuku bulduğu yola bağımlı değildir. Reaksiyon mekanizmasının ΔG üzerine hiçbir etkisi yoktur. Meselâ, glukozun CO_2 ve H_2O'ya oksitlenmesinde glukoz ister in vitro olarak yakılsın, ister hücre içinde enzimli reaksiyonlarla yükseltgensin, ortaya çıkan ΔG aynıdır. ΔG reaksiyon hızı hakkında da hiçbir bilgi vermez.

10.4. ΔG VE DENGE SABİTİ

$$A + B \rightleftharpoons C + D$$

denge reaksiyonunun serbest enerji değişimi,

$$\Delta G = \Delta G^\circ + RT \ln \frac{[C]\,[D]}{[A]\,[B]}$$

ifadesiyle verilir. Burada ΔG°, standart serbest enerji değişimi, R gaz sabiti, T mutlak sıcaklıktır. ΔG°, standart şartlardaki serbest enerji değişimi olup, 25 °C da ve A,B,C ve D'nin konsantrasyonları 1,0 M iken ölçülür. Özet olarak bir reaksiyonun serbest enerji değişimi, reaksiyona katılanların tabiatına ve konsantrasyonlarına bağlı bir değerdir.

Biyokimyasal reaksiyonlardaki serbest enerji hesaplamalarını basitleştirmek üzere bazı kabuller yapılmıştır. Standart halde pH'nın 7,0 olduğu, bu pH'daki H^+ ve H_2O aktivitesinin 1 olarak alınması kabul edilmiştir.

Denge durumunda $\Delta G = 0$ olacağından

$$0 = \Delta G^\circ + RT \ln \frac{[C]\,[D]}{[A]\,[B]}$$ ifadesinden

$\Delta G^\circ = -RT \ln K_c$ yazılır. Çünkü, denge durumunda konsantrasyonlar denge konsantrasyonu olacağından,

$$K_c = \frac{[C]\,[D]}{[A]\,[B]}$$ ifadesi gerçekleşir.

$\Delta G^\circ = -RT \ln K_c$ denklemi logaritmasının 10 tabanına göre alınmasıyla $\Delta G^\circ = -2{,}303\ RT \log K_c$ yazılabilir. Bu da düzenlenirse

$$K_c = 10^{-\Delta G^\circ / 2{,}303RT}$$

ifadesi çıkar ve burada $R = 1{,}98 \times 10^{-3}$ kcal/mol °K ve T = 298°K değerleri yerine konulduğunda

$$K_c = 10^{-\Delta G^\circ / 1{,}36}$$

bulunur. Görüldüğü gibi standart serbest enerji değişimi ile denge sabiti arasında basit bir bağıntı vardır. Meselâ $K_c = 10$ iken 25°C da $\Delta G^\circ = -1{,}36$ kcal/mol'dür.

Şimdi dihidroksiaseton fosfatın gliseraldehid 3-fosfat izomerine dönüştüğü

Dihidroksiaseton fosfat Gliseraldehid 3-fosfat

reaksiyonunun ΔG° ve ΔG değerlerini hesaplayalım. Bu, glukoz metabolizmasında göreceğimiz glikoliz yolu reaksiyonlarındandır. 25°C'daki dengede gliseraldehid 3- fosfatın dihidroksiaseton fosfata oranı 0,0475 olduğunda K_c de 0,0475'dir. Yukarıda çıkardığımız

ΔG° = -2,303 RT log K'_{eq} den

= $-2,303 \times 1,98 \times 10^{-3} \times 298 \times \log 0,0475$

= +1,8 kcal/mol bulunur.

Şimdi dihidroksiaseton fosfat başlangıç konsantrasyonunun 2×10^{-4} M, gliseraldehid 3-fosfat başlangıç konsantrasyonunun da 3×10^{-6} M olduğu reaksiyon için ΔG değerini bulalım. Verilenleri yerlerine koyduğumuz zaman

$$\Delta G = 1,8 + 2,303 \times 1,98 \times 10^{-3} \times 298 \times \log \frac{3 \times 10^{-6}}{2 \times 10^{-4}}$$

= 1,8-2,5 = -0,7 kcal/mol.

ΔG için bulanan negatif değer, izomerleşme reaksiyonunun her iki reaktifin yukarıda verilen konsantrasyonlarında kendiliğinden yürüyeceğini göstermektedir. Burada bu reaksiyon için ΔG° pozitif iken, ΔG negatif değerde olmaktadır. Sonuç olarak, bir reaksiyonunun kendiliğinden yürüyebileceğini ΔG° değil, ΔG değerinin tayin edebileceğini söyleyebiliriz.

Önemli bir termodinamik gerçek de birkaç basamak reaksiyonun tüm serbest enerji değişimi, herbir basamağın serbest enerji değişimlerinin toplamı olduğudur. Şimdi aşağıdaki reaksiyonu ele alalım:

$A \rightleftharpoons B+C$	ΔG° = + 5 kcal/mol
$B \rightleftharpoons D$	ΔG° = - 8 kcal/mol
$A \rightleftharpoons C+D$	ΔG° = - 3 kcal/mol

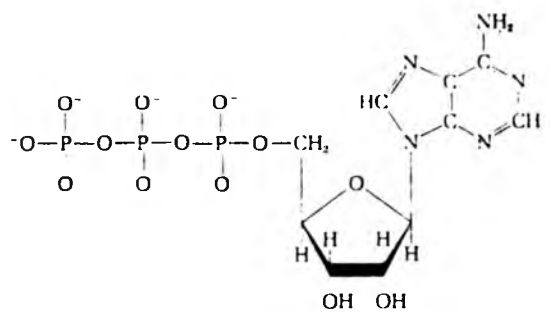
Standart şarlarda A, B ve C'ye kendiliğinden dönüştürülemez, çünkü ΔG° pozitiftir. Bununla beraber aynı şartlarda B,D'ye dönüştürülebilir. Serbest enerji değişimleri toplanabilir olduğundan, A'nın C ve D'ye dönüşmesinin ΔG° değeri -3 kcal/mol çıkar ve bu da bahsedilen reaksiyonun standart şartlarda kendiliğinden cereyan edebileceğini göstermektedir. Bundan da anlaşılmaktadır ki, termodina-

mik yönden mümkün olamayan reaksiyonlar, termodinamik yönden kolayca gerçekleşebilen bir başka reaksiyonun beraberliğinde olabilmektedir. Yukarıdaki reaksiyonlar birbirine ortak bir ara bileşen olan B ile bağlanmaktadır. Metabolizmada bu tip enerji bağlarıyla sık sık karşılaşacağız.

10.5. ATP (ADENOZİN TRİFOSFAT)

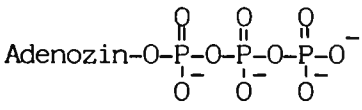
Canlı varlıklar aşağıdaki fonksiyonların yerine getirilmesi için devamlı bir serbest enerji kaynağına ihtiyaç duyarlar: (a) Kas kasılmasındaki ve diğer hücresel hareketlerdeki mekanik iş, (b) Molekül ve iyonların aktif transportu ve (c) Makromolekül ve diğer biyomoleküllerin basit başlangıç bileşiklerinden sentezlenmesi. Bu olaylarda kullanılan serbest enerji çevreden sağlanır. Kemotroflar bu enerjiyi gıda maddelerinden, fototroflar da ışık enerjisinden elde ederler. Gıdaların oksidasyonundan ve ışıktan türetilen serbest enerjinin bir kısmı hareket, aktif transport ve biyosentezde kullanılmadan önce özel bir şekle sokulur. Bu özel serbest enerji taşıyıcısı adenozin trifosfat (ATP)'dır. ATP'nin biyolojik sistemlerin enerji değişimindeki anahtar rolü ilk defa 1941 yılında Fritz Lipmann ve Herman Kalckar tarafından ortaya koyulmuştur.

ATP, bir adenin, bir riboz ve bir de trifosfat birimi ihtiva eden bir bileşiktir. Açık formülü aşağıda gösterilmiştir.

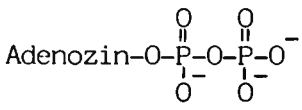


Adenozin trifosfat (ATP)

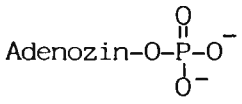
ATP'nin aktif şekli Mg^{+2} veya Mn^{+2} iyonları ile kompleks teşkil eden yapısıdır. ATP'nin enerji taşıyıcısı özelliğinde en önemli rolü trifosfat birimi oynamaktadır. Çünkü molekülün bu kısmında, hidrolizlendiği zaman yüksek oranda serbest enerjinin açığa çıktığı iki adet fosfoanhidrit bağı mevcuttur. ATP, adenozin difosfat (ADP) ve ortofosfata (P_i) hidrolizlendiği gibi, adenozin monofosfat (AMP) ve pirofosfata (PP_i) da parçalanabilir. Bu reaksiyonlar için $\Delta G°$ değeri ortamın iyonik şiddetine ve Mg^{+2}, Ca^{+2} konsantrasyonlarına bağlıdır. Biz $\Delta G° = -7,3$ kcal/mol alacağız.



Adenozin trifosfat (ATP)



Adenozin difosfat (ADP)



Adenozin monofosfat (AMP)

Tipik hücresel şartlar altında, bu parçalanmalar sonucu açığa çıkan serbest enerji -12 kcal/mol kadar bir değere ulaşabilir.

$$ATP + H_2O \rightleftharpoons ADP + P_i + H^+ \quad \Delta G° = -7,3 \text{ kcal/mol}$$

$$ATP + H_2O \rightleftharpoons AMP + PP_i + H^+ \quad \Delta G° = -7,3 \text{ kcal/mol}$$

ATP, ADP ve AMP birbirlerine çevrilebilir. Aşağıdaki reaksiyon buna örnek olarak verilebilir.

$$ATP + AMP \rightleftharpoons 2\ ADP$$

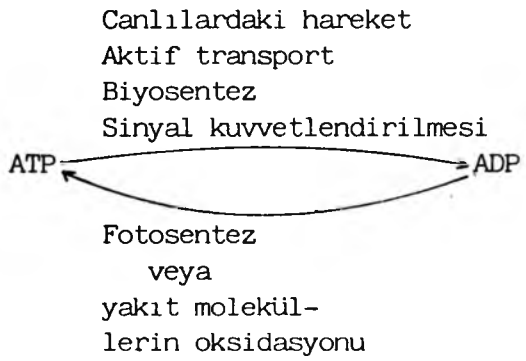
Bu reaksiyon adenilat kinaz enzimi tarafından katalizlenir.

Bazı biyosentez reaksiyonları ATP'ye benzer nükleotidler tarafından yürütülür. Bunlar guanozin trifosfat

(GTP), üridin trifosfat (UTP)'dır. Bu bileşiklerin fosforil grupları bir nükleotidden diğerine enzimler tarafından taşınabilir. Aşağıdaki reaksiyon buna bir örnektir.

$$ATP + GDP \rightleftharpoons ADP + GTP$$

ATP, biyolojik sistemlerde serbest enerjinin depolanma şeklinden ziyade ihtiyaç olduğu anda enerjinin acil kaynağı olarak vazife görür. Herhangi bir hücrede ATP, teşekkülünden sonra bir dakika içinde kullanılır. ADP ve ATP arasındaki devir çok hızlıdır. Meselâ, istirahat halinde bir insan 24 saat içinde 40 kg ATP kullanır. Eksersiz halinde ise, dakikada 0,5 kg kadar ATP harcar. Canlılardaki hareket, aktif transport, sinyal kuvvetlendirilmesi ve biyosentez ancak ve ancak ATP'nin devamlı olarak tekrar ve tekrar üretilmesiyle mümkündür (Şekil 10.5). Fototroflar ATP'yi ışık enerjisini yakalayarak, kemotroflar da besin maddelerini oksitleyerek üretirler.



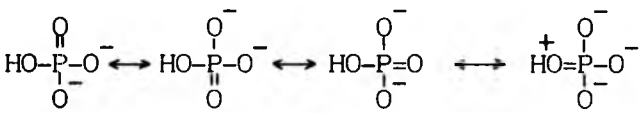
Şekil 10.5. Biyolojik sistemlerdeki ATP-ADP devri.

Acaba ATP'nin fosfat grubunun tranferiyle, yani hidroliziyle niçin yüksek bir serbest enerji açığa çıkmaktadır. Bunun cevabını ATP hidrolizi standart serbest enerjisini, gliserol 3-fosfattaki fosfat esterinki ile mukayese ederek verelim:

$$ATP + H_2O \rightleftharpoons ADP + P_i + H^+ \quad \Delta G^\circ = -7{,}3 \text{ kcal/mol}$$

$$\text{Gliserol 3-fosfat} + H_2O \rightleftharpoons \text{Gliserol} + P_i \quad \Delta G^\circ = -2{,}2 \text{ kcal/mol}$$

Görüldüğü gibi, gliserol 3-fosfat hidrolizi için ΔG°, ATP'ninkinden oldukça düşüktür. Yani ATP, gliserol 3-fosfattan yüksek bir fosfat grubu transfer potansiyeline sahiptir. Bunun sebebini ortaya koymak için ATP'nin yapısını incelememiz gerekmektedir. Bu konuda iki faktörün etkili olduğu görülür: 1) Elektrostatik itme, 2) Rezonans kararlılığı. pH 7,0'da ATP'nin trifosfat birimi dört tane negatif yük taşımaktadır. Bunlar birbirlerine yakın olduklarından aralarında kuvvetli bir itme husule gelir. ATP'nin yüksek grup transferi potansiyeline sebep olan ikinci faktör de, ADP ve P_i'nin ATP'ye göre daha yüksek bir rezonans kararlılığa sahip olmasıdır. Meselâ, ortofosfatın aynı enerjiye sahip dört rezonans şekli (Şekil 10.6) varken, ATP'deki herbir fosfat grubu daha az sayıda rezonans şekle sahiptir. Etil asetat hidroliz olduğu zaman, ürünlerden birisi olan etanol önemli bir rezonans kararlılığa maruz kalmamasına rağmen, asid anhidridlerin hidrolizinde her iki ürün de daha yüksek bir rezonans kararlılığına sahip olacaktır. Bu yüzden de asit anhidridlerin hidrolizi için ΔG° değeri esterlerinkinden daha negatiftir.



Şekil 10.6. Ortofosfatın rezonans şekilleri.

Biyokimyacıların kullandığı yüksek enerjili fosfat bağı terimi bağ enerjisi ile karıştırılmamalıdır. Çünkü bağ enerjisi bir bağı parçalamak için gerekli olan enerji iken, yüksek enerjili fosfat bağı fosforilli bileşiğin ortofosfat vermek üzere hidrolizlenmesi olayında açığa çıkan serbest enerjidir.

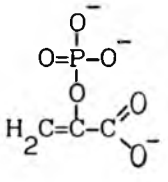
Biyolojik sistemlerde yüksek enerjili fosfat bağı ihtiva eden bazı bileşikler daha vardır. Hatta bunlardan fosfoenolpiruvat, asetil fosfat ve kreatinfosfat gibi bileşiklerin hidrolizΔG° değeri ATP'ninkinden daha nega-

tiftir. Bu, fosfoenolpiruvatın fosfat grubunun ADP'ye transfer edilerek ATP husule getirilebileceğini göstermektedir. Gerçekten glukoz metabolizmasının bir basamağında bu yolla ATP sentezlenmektedir. Tablo 10.2'ye baktığımız zaman, ATP'nin hidroliz $\Delta G°$'ın biyolojik öneme sahip fosforilli moleküller arasında ortalarda yer aldığı görülmektedir. ATP'nin bu pozisyonu fosforil grubu taşıyıcısı olarak avantaj sağlamaktadır.

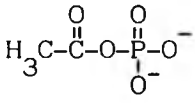
Tablo 10.2. Biyolojik önemi olan bazı fosforilli moleküllerin hidroliz serbest enerjileri.

Bileşik	$\Delta G°$ (kcal/mol)
Fosfoenolpiruvat	-14,8
Karbamoil fosfat	-12,3
Asetil fosfat	-10,3
Kreatin fosfat	-10,3
Pirofosfat	-8,0
ATP (ADP'ye dönüşümü)	-7,3
Glukoz 1-fosfat	-5,0
Glukoz 6-fosfat	-3,3
Gliserol 3-fosfat	-2,2

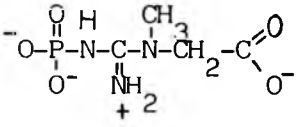
Tabloda ATP'den daha yüksek $\Delta G°$ değerine sahip olduğu görülen bazı bileşiklerin açık formülleri aşağıda gösterilmiştir.



Fosfoenolpiruvat



Asetil fosfat



Kreatin fosfat

ATP hidrolizinin reaksiyon dengesine etkisi: Termodinamik yönden yürümesi mümkün olmayan bir reaksiyonun ATP beraberliğinde nasıl cereyan ettiğini göstermek için

$$A \rightleftharpoons B \qquad \Delta G°=+4 \text{ kcal/mol}$$

reaksiyonunu ele alalım. 25°C' da bu reaksiyonun denge sabiti

$$\frac{[B]}{[A]} = K_c = 10^{-\Delta G/1,36} = 1,15x10^{-3}$$

olarak bulunur. Bu da $[B]/[A]$ oranının $1,15x10^{-3}$'e eşit veya daha büyük değerlerinde A'nın B'ye kendiliğinden dönüştürülmeyeceğini göstermektedir. Fakat bu reaksiyon ATP hidroliziyle beraber cereyan ettiği zaman $[B]/[A]$ oranı $1,15x\ 10^{-3}$'den büyük bile olsa A'nın B'ye çevrilmesi gerçekleşebilir. Böyle bir reaksiyonun denklemini yazalım:

$$A+ATP+H_2O \rightleftharpoons B+ADP+P_i+H^+ \qquad \Delta G°=-3,3 \text{ kcal/mol}$$

Bu reaksiyonun denge sabiti K_c'yi yazarsak,

$$K_c = \frac{[B]}{[A]} \times \frac{[ADP][P_i]}{[ATP]} = 10^{3,3/1,36} = 2,67x10^2$$

bulunur. $[B]/[A]=K_c \cdot \frac{[ATP]}{[ADP]\,[P_i]}$ ifadesini de yazabiliriz.

ATP üreten hücrelerde $[ATP]/[ADP]\,[P_i]$ oranı 500 civarındadır. Bu değeri ve K_c'yi yerine koyduğumuz zaman

$$[B]/[A] = 2,67x10^2 x500 = 1,34x10^5$$

bulunur. Bu da ATP'nin hidrolizi sayesinde, $[B]/[A]$ oranı $1,34x10^5$ değerine erişinceye kadar A'nın B'ye çevrilmesinin kendiliğinden gerçekleşeceğini göstermektedir. Diğer bir deyimle ATP hidrolizi $[B]/[A]$ denge oranını 10^8 defa artırmış olmaktadır.

Yukarıdaki örnekte bir ATP hidroliziyle reaksiyon dengesinin 10^8 defa ürünler lehine kaydığını gördük. Eğer n molekül ATP hidrolizlense, denge sabiti 10^{8n} defa büyüyecektir. 3 ATP'nin hidrolizlendiği bir reaksiyon dengesi 10^{24} oranında değişecektir. Verilen örnekteki A ve B'yi genelleştirirsek, bunlar bir proteinin iki farklı konformasyonunu temsil edebilirler. Meselâ kas proteini gözönüne alındığında, kasın gevşek az enerjili hali A, gerilmiş çok enerjili hali de B olabilir. Bir iyon veya molekülün hücre içindeki ve dışındaki konsantrasyonu da aynen besin maddelerinin aktif transportunda olduğu gibi, verilen örnekteki A ve B tarafından temsil edilebilir. Kompleks organik bileşiklerin basit başlangıç maddelerinden sentezinde de, A ve B bu molekülleri gösterebilir.

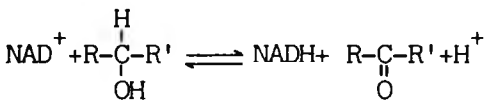
10.6. METABOLİZMADAKİ ELEKTRON TAŞIYICILARI

Kemotroflar serbest enerji ihtiyaçlarını glukoz ve yağ asitleri gibi besin maddelerinin oksidasyonundan temin ederler. Aerobik organizmalarda en son elektron alıcısı O_2'dir. Yakıt molekülleri ve onların parçalanma ürünlerinden elektronlar O_2'ye doğrudan doğruya transfer edilemezler. Bu substratlar, elektronlarının önce özel yapıdaki piridin nükleotidlere ve flavinlere aktarırlar. Bu taşıyıcıların indirgenmiş formları yüksek potansiyelli elektronlarını, mitokondri iç membranında yerleşmiş bulunan bir elektron-transport zinciri vasıtasıyla O_2'ye aktarırlarken ATP sentezlenir. Bu olaya oksidatif fosforilasyon adı verilir. Bunun yanısıra yakıt moleküllerinin oksidasyonundan ortaya çıkan yüksek potansiyelli elektronlar, ATP'den başka indirgeyici güce ihtiyaç gösteren biyosentez olaylarında da kullanılır.

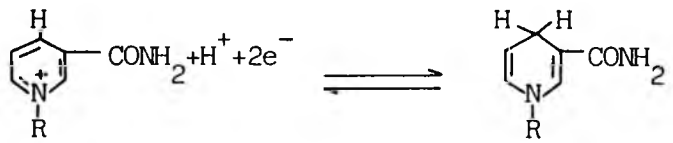
Nikotinamid adenin dinükleotid (NAD^+), besin moleküllerinin oksidasyonunda en başta gelen elektron alıcısıdır (Şekil 9.4). NAD^+'nin reaktif kısmı onun nikotinamid halkasıdır. Bir substratın oksidasyonunda, NAD^+'nin nikotinamid halkası bir hidrür iyonuna eşdeğer olan iki

elektron ve bir hidrojen iyonu kabul eder. NAD^+'nin indirgenmiş hali NADH ile gösterilir.

NAD^+, aşağıda bir örneği verilen tipteki birçok reaksiyonda elektron alıcısı olarak görev yapmaktadır.

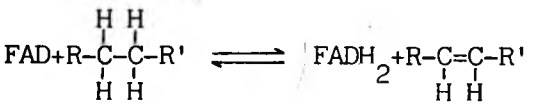


Dehidrogenasyon reaksiyonu adı verilen bu gibi reaksiyonlarda, substrat üzerindeki hidrojen iyonlarından birisi doğrudan NAD^+'ye transfer edilirken diğeri de çözeltiye geçer. Substrat tarafından kaybedilen her iki elektron da nikotinamid halkasına aktarılır. Aşağıda NAD^+'nin yükseltgenmiş ve indirgenmiş formları gösterilmiştir.

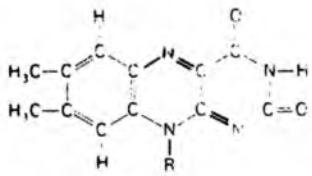


NAD^+ NADH

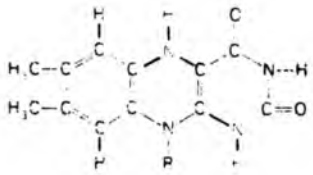
Besin moleküllerinin oksidasyonunda görev yapan ikinci bir elektron taşıyıcısı da flavin adenin dinükleotiddir (Şekil 9.3). Okside ve redükte formları kısaca FAD ve $FADH_2$ ile gösterilen bu nükleotid aşağıdaki tipte dehidrojenasyon reaksiyonlarında elektron taşır.



FAD'nin reaktif kısmı izoalloksazin halkasıdır. FAD de NAD^+ gibi iki elektron taşıyıcısıdır, fakat substratın kaybettiği iki hidrojen atomunu da kabul eder. FAD' nin indirgenmiş ve yükseltgenmiş şekilleri aşağıdadır.



FAD



$FADH_2$

Birçok biyosentez olayında ön maddeler, ürünlerden daha yükseltgenmiş halde bulunurlar. ATP'nin yanısıra indirgeyici güce de ihtiyaç gösterirler. Mesela yağ asitlerinin biyosentezinde eklenen iki karbon birimindeki keto grubu birkaç basamak reaksiyonla metilen grubuna indirgenir. Bu reaksiyon basamaklarında dört elektrona ihtiyaç vardır.

$$R\text{-}CH_2\text{-}\overset{O}{\overset{\|}{C}}\text{-}R' + 4H^+ + 4e^- \longrightarrow R\text{-}CH_2\text{-}CH_2\text{-}R' + H_2O$$

İndirgeyici biyosentez olaylarının çoğunda elektron vericisi, nikotinamid adenin dinükleotidfosfat (NADPH)' dır. NADPH'da NADH'dan farklı olarak riboz biriminin 2'-hidroksil grubu, fosfat ile ester yapmış haldedir. NADPH aynen NADH gibi elektron taşır. Bununla beraber NADPH tamamen indirgeyici biyosentez olaylarında kullanılırken NADH ATP sentezinde görev alır. NADPH üzerindeki fosfat grubu, bu molekülün indirgemeyi katalizleyen enzimler tarafından tanınmasını sağlar.

Burada NADH, NADPH ve $FADH_2$'nin, katalizörlerin yani enzimlerin yokluğunda O_2 ile çok yavaş reaksiyona girdiklerini belirtmeliyiz. Aynı şekilde ATP de enzimsiz çok yavaş bir hızda hidrolizlenir. Bu moleküller, reaksiyon vermeleri termodinamik yönden çok kolay olduğu halde, kinetik yönden çok kararlıdır. Spesifik enzimlerin yokluğunda gözlenen bu kararlılık, bunların biyolojik fonksi-

yonları için son derece önemlidir, çünkü bu yolla enzimlerin serbest enerji ve indirgeyici güç akışını kontrol etmeleri mümkün olur.

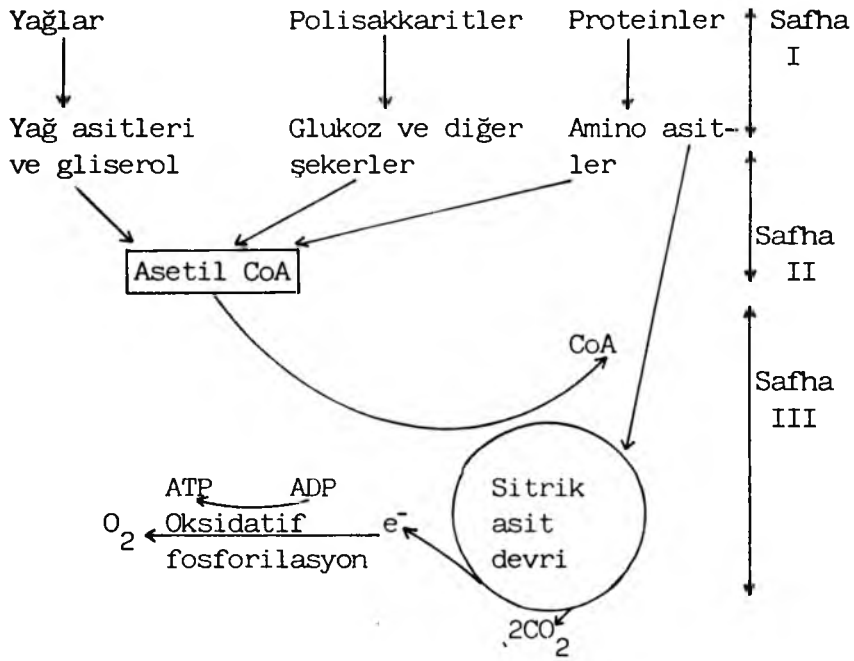
10.7. KATABOLİZMA VE ANABOLİZMA

Metabolizma, katabolizma ve anabolizma olarak ikiye ayrılır. Ketabolizma, hücrenin çevresinden aldığı veyahut kendi depolarından kullandığı büyük besin moleküllerini (karbohidratlar, lipidler ve proteinler) çoğunluğu oksitadif mahiyetteki enzimatik reaksiyonlarla, laktik asit, asetik asit, CO_2, amonyak veya üre gibi bir seri daha küçük moleküllere parçalanması olayıdır. Bu esnada da büyük organik bileşiklerin yapısında bulunan serbest enerjinin açığa çıkmasıyla yüksek enerjili fosfat bağları (ATP) hasıl olur.

Anabolizma ise, polisakkaritler, nükleik asitler, lipidler ve proteinler gibi hücrenin bileşenlerini teşkil eden nisbeten büyük moleküllerin basit ön bileşiklerden sentezlenmesi olayıdır. Biyosentez hadisesi yapının daha büyümesi ve daha da kompleks bir düzene girmesini netice verdiğinden, bir entropi azalması söz konusudur. Bu azalış da ATP'nin parçalanmasıyla ortaya çıkan serbest enerji tarafından karşılanır. Sentezlenen bileşikler başlangıç maddelerine oranla daha indirgenmiş olduklarından, lüzumlu elektron ve hidrojenler indirgeyici güç kaynağı olan NADPH tarafından sağlanır. Katabolizma ve anabolizma hücre içinde beraberce vuku bulur.

Şimdi ileride teferruatlı şekilde inceleyeceğimiz metabolizma olaylarını genel olarak ele alacağız. Hans Krebs, besin maddelerinin oksidasyonundan enerji üretiminin, yani katabolizmanın üç safhada vuku bulduğunu ileri sürmüştür. **Birinci safha**da besin maddelerindeki büyük moleküller daha küçük birimlere parçalanır. Proteinler yirmi çeşit amino asitlere, polisakkaritler glukoz gibi basit şekerlere ve yağlar da gliserol ve yağ asitlerine hidrolizlenirler. Bu safhada iş görecek enerji üretilmez.

İkinci safhada ise, bu çok sayıdaki küçük moleküller, metabolizmada merkezi rolleri olan birkaç basit birimlere dönüştürülürler. Gerçekten şekerler, yağ asitleri, gliserol ve bazı amino asitler asetil CoA'nın asetil grubuna çevrilirler. Bu basamakta birkaç ATP sentezlenir, fakat asetil CoA'nın tümünün oksidasyonundan elde edilecek ATP miktarının yanında çok az kalır. **Üçüncü safha**, sitrik asit devri ve oksidatif fosforilasyondan ibarettir ve yakıt moleküllerinin yıkımındaki son müşterek yolu teşkil ederler. Bu devire asetil CoA şeklinde getirilen asetil birimleri, tamamen CO_2'ye yükseltgenir ve bu arada beher asetil başına dört çift elektron, NAD^+ ve FAD'ye transfer edilir. Daha sonra da bu elektronların NADH ve FADH'dan O_2'ye kadar akışı sonucu oksidatif fosforilasyon adı verilen prosesle ATP sentezlenir. Besin maddelerinin yakılmasıyla husule gelen ATP'nin büyük bir bölümü bu üçüncü safhada teşekkül eder. Şekil 10.7'de bahsi geçen katabolizma safhaları şematize edilmiştir.



Şekil 10.7. Besin maddelerinin katabolizma safhaları.

Anabolizma da, katabolizmanın üçüncü safhasındaki küçük yapı taşlarından başlayarak üç safhada vuku bulur. Meselâ protein sentezi, sitrik asit devrinde yer alan α-keto asitlerinin ikinci safhadaki aminasyonu ile husule gelen α-amino asitlerinden birinci safhada gerçekleşir. İlerideki bölümlerde anlatılacağı gibi üçüncü safha hem katabolizma hem de anabolizmanın müşterek basamağıdır.

Katabolik ve anabolik olayların en önemli özelliklerinden birisi de aynı reaksiyon basamaklarına sahip olmamalarıdır. Meselâ, glikojenin laktik aside çevrilmesi çok iyi bilinen 12 enzimatik basamakla gerçekleşmektedir. Fakat laktik asitten glikojen sentezinde katabolik 12 enzimatik basamaktan 9'u kullanılmakta ve 4 tane değişik enzim de görev almaktadır. Aynı şekilde proteinler ve amino asitler, asetil CoA ve yağ asitleri arasındaki katabolik yollar da birbirinden farklıdır. Katabolizma için ayrı, anabolizma için ayrı iki metabolik yol israf gibi görünmesine rağmen, katabolizma yolu enerjetik noktadan anabolizma için mümkün olmadığından, farklı yollar mutlak bir ihtiyaçtan doğmaktadır. Çünkü katabolizma enerji yönünden yokuş aşağı bir durum arzederken, sentez olayları yokuş yukarı çıkmağa benzemektedir. Yokuştan aşağı itilen bir kaya parçası en kestirme yoldan dikine inerken, aynı taşı yukarı çıkarırken takip edilecek ve en az enerji sarfedilecek yol mutlaka farklı olacaktır.

Özellikle ökaryotik hücrelerde katabolizma ve anabolizma yolları hücre içi yerleşimi noktasından da farklılık gösterirler. Meselâ, yağ asitlerinin asetil CoA'ya kadar parçalanmasını katalizleyen enzimler mitokondri matriksinde yer alırken, yağ asitlerinin asetil CoA'dan sentezi mitokondri dışı sitoplazmada bulunan enzimler marifetiyle gerçekleşir. Birbirine paralel katabolik ve anabolik yolların hücrenin ayrı bölümlerinde yer alması, bu iki olayın birbirinden bağımsız olarak aynı zamanda vuku bulmasını sağlar.

Metabolizmanın hemen hemen bütün reaksiyonları bir diğerine bağlantılıdır; çünkü bir enzimatik reaksiyonun ürünü, bir sonraki reaksiyon serisinin substratı olur. Böyle reaksiyon serileri metabolit moleküllerinin spesifik fonksiyonel gruplarının enzimatik reaksiyonlarla uzaklaştırılıp, alıcı moleküllere transferleriyle mümkün olmaktadır. Ara metabolizmanın birçok reaksiyonları amino, asetil, fosfat, metil, formil, karboksil gruplarının veya hidrojen atomlarının basamak basamak transferlerini ihtiva etmektedir.

Metabolik yolların hücre içi kontrolü: Genellikle bir hücredeki katabolik hız, çevresindeki besin maddelerinin konsantrasyonundan ziyade ATP şeklindeki enerji ihtiyacı tarafından kontrol edilir. Kısacası hücreler cari aktiviteleri için gereken enerjiyi üretecek miktarda yakıt, yani besin maddesi kullanır. Aynı şekilde hücre bileşenlerinin biyosentez hızı acil ihtiyaçlarına göre ayarlanır. Meselâ, hücrelerdeki amino asit sentezi, protein sentezi için gerekli olan minimum seviyede amino asit sağlayacak hızda gerçekleşir. Özetle hücredeki metabolizma olaylarında hiçbir besin maddesi israf edilmez, ihtiyaç duyulan kadarı kullanılır, gerektiği kadar sentez yapılır, yani kısaca hücre maksimum ekonomi prensiplerine uygun çalışan bir sistemdir.

Metabolik yolların düzenlenmesi çeşitli seviyelerde olur. Bunları komplekslik sırasına göre ele alacağız.

1. En basit düzenlenme tipi, enzimatik reaksiyon hızlarına tesir eden parametreleri kapsar. Multienzim serisindeki herbir enzimin karakteristik bir optimum pH'sı, substratları, ürünleri ve hatta koenzim veya metal iyonlarına özel afinitesi vardır. Hücrede böyle bir multienzim sistemi reaksiyonlarının net hızı, herbir enzim konsantrasyonunun, hücre içi pH'sının, herbir ara bileşiğin ve aktivite için gerekli olan metal iyonu veya koenzimlerin konsantrasyonlarının fonksiyonudur. Hücre içi pH'sı, hücre içindeki bütün proton salan ve proton alan reaksi-

yonların nisbi hızlarının fonksiyonu olduğu için, belirli bir metabolik yolun hızı hücre içi pH'yı değiştirebilen herhangi bir hücre içi proses tarafından etkilenebilir. Aynı şekilde herbir metabolik ara bileşiğin hücre içindeki konsantrasyonu, onun teşekkül ve kullanılma hızlarının bileşkesidir. Bu, incelenen enzim sisteminin aktivitesinin yanısıra bu ara bileşiği sentezleyen ve kullanan diğer enzimatik reaksiyon hızlarına bağlıdır. Enzimlerin bağlamak için yarıştıkları Mg^{+2} gibi metal iyonlarının ve koenzimlerin konsantrasyonları için de aynı şeyleri düşünebiliriz.

2. İkinci düzenleme mekanizması, enzimler konusunda incelediğimiz allosterik enzimler tarafından gerçekleştirilir. Düzenleyici enzimler adı da verdiğimiz bu enzimlerin çoğu son ürün tarafından inhibe edilirler (feedback inhibisyonu). Bazıları da modülatörler tarafından stimüle ve aktive edilebilirler. Meselâ ADP'nin birçok katabolizma reaksiyonlarındaki düzenleyici enzimleri aktive ettiği gibi. Bazı allosterik enzimler çok değerlikli olup, iki veya daha fazla reaksiyonun ürünlerine cevap verirler. Bunun yanısıra anabolik ve katabolik reaksiyon dizilerinin düzenleyici enzimleri ve bunları etkileyen faktörler farklı olduğundan, bu iki yol birbirlerinden bağımsız olarak düzenlenip kontrol edilirler.

3. Metabolik düzenlenmenin üçüncü seviyesi enzim sentezi hızının genetik yoldan kontrolüdür. Belirli bir metabolik yolun hızı, o yolda görev yapan enzimlerin hücre içi konsantrasyonuna yakından bağlıdır. Bazı enzimlerin intraselüler konsantrasyonu sabit iken, bazılarının konsantrasyonu da belirli substratların mevcudiyetine bağlıdır. Bu enzimlerin sentezi ile ilgili bilgileri taşıyan genler bir baskı altındadırlar ve bu baskı bazı bileşikler vasıtasıyla ortadan kaldırılabilir. Hatta bir multienzim sistemindeki enzimlerin tamamının sentezi beraberce baskılanabilir veya uyarılabilir, çünkü bunların sentezi, DNA üzerinde ve operon adı verilen birbirini takip eden genler tarafından şifrelenir. Bunlar da beraberce baskılanır veya uyarılır.

4. En kompleks seviyede metabolik kontrol, endokrin sistemi tarafından gerçekleştirilir. Endokrin sisteminden, hedef doku ve organlardaki metabolik aktiviteleri uyaran veya inhibe eden ve hormon adı verilen kimyasal haberciler ifraz edilir. Pankreas tarafından salgılanan insulindeki yetersizlik, glukozun hücre içine girişini azaltır ve bunun sonucu olarak keton cisimleri artar, yağ asitlerinin biyosentezi azalır. Az miktarda insulin enjeksiyonu durumu düzeltir. Bazı hormonların etki mekanizmaları bilinmesine rağmen, birçoğunun metabolik aktiviteyi nasıl değiştirdikleri henüz meçhuldur. Bazılarının etkisi, hücre membranlarının transport aktivitesini artırmak tarzında, bazılarının ise gen ifadesi seviyesinde olduğu tahmin edilmektedir.

11. BÖLÜM: KARBOHİDRAT METABOLİZMASI

Şimdi daha önceki bölümlerde yapılarını incelediğimiz biyomoleküllerin metabolizmalarını, karbohidratların canlı organizmada karşılaştıkları dönüşüm ve değişmelere öncelik vererek inceleyeceğiz.

Karbohidrat metabolizması sözü hemen hemen glukoz metabolizmasıyla eşdeğerdir. Çünkü heterotroflar karbohidratların tamamına yakınını glukoz şeklinde alırlar. Diğer şeker türleri de (fruktoz, galaktoz, mannoz ve pentozlar) organizmada ya önce glukoza çevrilirler veya glukoz metabolizmasına bir ara basamakta dahil olurlar.

Metabolizma olaylarını incelerken, bunların insan biyokimyası ile ilgili yönleri üzerinde özellikle duracağız. Bundan dolayı bu bölüme karbohidratların sindirimi ile başlayıp, daha sonra sırasıyla glukoz veya glikojenin piruvat ve laktata kadar anaerobik oksidasyonunu (glikoliz), sitrik asit devrini (TCA devri), glioksilat devrini, oksidatif fosforilasyonu, pentoz fosfat yolunu ve glukozun karbohidrat yapısında olmayan bileşiklerden sentezini (glukoneogenez) inceleyeceğiz. Şekerlerin sentezini netice verdiğinden fotosentez konusunu burada fazla ayrıntıya girmeden ana hatlarıyla işliyerek, son olarak da glikojenin yıkım ve sentez mekanizmasını ele alacağız.

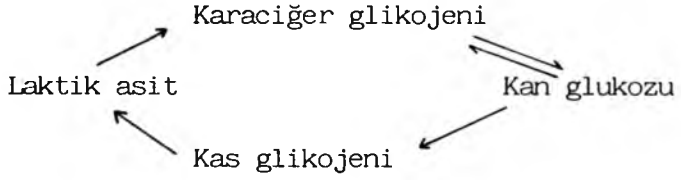
11.1. KARBOHİDRATLARIN SİNDİRİMİ VE CORİ DEVRİ

İnsan diyetindeki başlıca karbohidrat kaynakları, nişasta ve glikojen gibi α-glikozid bağlarına ve glukoz birimlerine sahip olan polisakkaritler ile sukroz ve laktoz gibi disakkaritlerdir. Bunlar bir enzim serisi tarafından monosakkaritlere kadar hidrolizlenirler. Bu enzimler şunlardır: (1) Tükrük amilazı; bir $\alpha(1 \longrightarrow 4)$- gli-

kozidazı olup nişasta ve glikojeni oligosakkaritlere parçalarken çok az miktarda da maltoz ve glukoz meydana gelir. (2) Pankreas amilazı; çok aktif olan bu enzim nişasta ve dekstrinleri maltoza parçalar. (3) Pankreas maltazı; maltozun glukoza hidrolizlenmesini katalizler. (4) İnce bağırsak mukozasından salgılanan maltaz, sukraz ve laktaz sırasıyla maltoz, sukroz ve laktoz disakkaritlerini parçalar.

Bağırsaktan yalnız monosakkaritler emilebilir ve kullanılabilir. Disakkaritler ve bazı polisakkaritler kana enjekte edildiği zaman hiçbir değişikliğe uğramadan vücuttan atılırlar. Monosakkaritler farklı hızlarda emilirler. D-Glukozun emilme hızını 100 alırsak, D-galaktoz 110, D-fruktoz 43, D-mannoz 19, D-ksiloz 15 ve D-arabinoz 9'luk bir hızla bağırsak duvarını aşarlar. Bunlardan glukoz, galaktoz ve fruktoz dolaşımdaki daha yüksek bir konsantrasyona karşı serbest enerji kullanılmasıyla aktif olarak emilirlerken, diğerleri difüzyonla geçerler.

Absorbsiyondan sonra monosakkaritler taşıyıcı dolaşımla karaciğere ulaştırılırlar ve burada hepsi glukoza çevrilirler. Glukoz, ya glikojene çevrilir, ya da kan vasıtasıyla dokulara taşınır. Glikojen, glukozun depolanma şekli olup, kandaki glukoz seviyesinin normalde tutulması için çok önemli bir kaynak vazifesini görür. Dokulara giden glukoz ise ya hemen kullanılır veya kullanılmaya hazır bir enerji kaynağı olan glikojen şeklinde depolanır. Glikojenin kaslardaki yıkımı sonucu hasıl olan laktik asit, karaciğere taşınarak orada tekrar glikojene çevrilir. Karaciğer glikojeninden kan glukozuna, kas glikojenine, laktik aside ve buradan tekrar karaciğer glikojenine kadar olan dönüşümlere Cori devri adı verilir. Bu devri şematik olarak şöyle özetleyebiliriz:



Kandaki normal glukoz konsantrasyonu 100 ml'de 65-110 mg iken bu değerlerin altındaki seviyeye hipoglisemi, üstündeki seviyeye de hiperglisemi adı verilir. Glukoz miktarı yaklaşık 170 mg/100 ml'den yukarı çıkarsa, böbrek eşiğini aşarak idrara geçer. Bu olaya glukozüri adı verilir.

11.2. GLİKOLİZ

Glikoliz, biyolojik sistemlerin hemen hemen tamamında bulunan ve glukozun piruvata[x] çevrilmesini ve bu esnada da bir miktar ATP üretimini gerçekleştiren reaksiyon serisine verilen isimdir. Embden-Meyerhof yolu olarak da adlandırılır. Aerobik organizmalarda glikoliz, glukozun ihtiva ettiği enerjinin çoğunun yüksek enerjili fosfat bağına çevrildiği sitrik asit devri ve elektron transport zincirinden önce gelen bir glukoz yıkım basamağıdır. Aerobik şartlarda, piruvat mitokondriye girer ve burada tamamen CO_2 ve H_2O'ya oksitlenir. Eğer O_2 yetersizse (meselâ kastaki aktif faaliyet durumunda) piruvat laktata çevrilir. Maya hücreleri gibi bazı anaerobik organizmalarda piruvat etanole dönüştürülür. Etanol ve laktatın glukozdan teşekkülü fermentasyonun[xx] örnekleridir.

Glikoliz yolunun aydınlatılmasının zengin bir tarihçesi vardır. Bu önemli metabolik yolun ortaya çıkarılmasıyla biyokimyanın gelişmesi elele yürümüştür. Bu alanda ilk önemli keşif 1897 yılında Hans Buchner ve Eduard Buchner tarafından tamamen bir raslantı sonucu yapılmıştır. Tedavi amacıyla hazırladıkları maya ekstraktlerini

---

[x] Fizyolojik pH'da karboksilik asitler iyonlaştığından dolayı onların anyon isimlerini de sık sık kullanacağız. Meselâ piruvik asit yerine piruvat, laktik asit yerine laktat gibi.

[xx] Fermentasyon: Organik bileşiklerin hem elektron vericisi hem de alıcısı olarak hareket ettiği ATP üreten bir prosestir. O_2 yokluğunda da vuku bulabilir. Pasteur tarafından keşfedilmiş ve "havasız şartlarda hayat" olarak tarif edilmiştir.

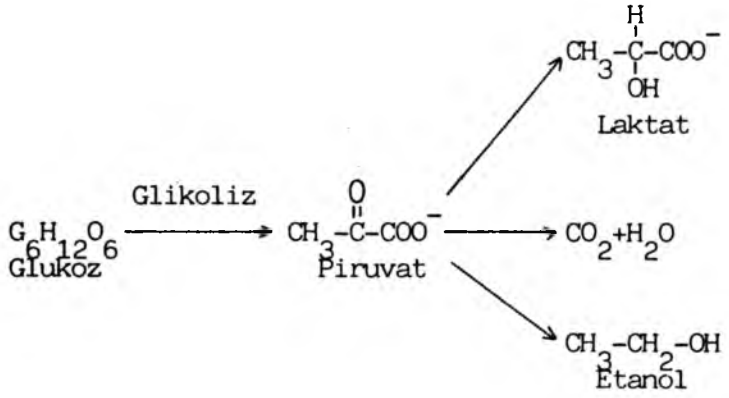
saklamak için antiseptik dışında bir yol denemek istediler ve mutfakta bu maksatla kullanılan sukrozu ekstraktlere ilâve ettiler. Sonuç çok şaşırtıcı idi; sukroz kısa bir sürede etanole fermente edilmişti. Sözü edilen buluş ile Buchnerler fermentasyonun canlı hücre dışında da teşekkül edebileceğini göstermişlerdir. Böylece metabolizma olayının kimyasal prensiplere uygun olarak vuku bulduğunu kabul eden modern biyokimya anlayışına kapı açılmış oldu.

Bu alanda daha sonra en önemli basamak, Arthur Harden ve William Young'un çalışmalarıyla aşılmıştır. Bu bilim adamları, maya özsuyunu glukoz çözeltisine ilâve ettikleri zaman fermentasyonun aniden başladığını müşahede ettiler. Bununla beraber çözeltiye inorganik fosfat katılmadığında, fermentasyon hızı da aniden azalıyordu. Daha sonra, bu inorganik fosfatın fermentasyon esnasında kaybolduğunu ve bir şeker fosfat teşkil etmek üzere kullanıldığını buldular. Harden ve Young maya özsuyunda fermentasyon için iki çeşit bileşiğin olduğunu keşfettiler: zimaz ve kozimaz. Maya özsuyunu 50 °C'a kadar ısıttıkları veya diyalizledikleri zaman aktivite kaybolmaktaydı. Diyalizlenmiş çözeltiye inaktif ısıtılmış çözelti ilâve edildiğinde aktivite tekrar kazanılmıştır. Sonuç olarak fermentasyon aktivitesinin; (1) ısıya dayanıksız ve diyalizlenmeyen ve (2) ısıya dayanıklı ve diyalizlenebilen iki sınıf bileşiğe bağımlı olduğu ortaya konuldu. Bugün zimazın birçok enzimden, kozimazın ise metal iyonlarından, ATP ve ADP'den ve NAD^+ gibi koenzimlerden ibaret olduğu bilinmektedir.

Daha sonraki yıllarda kas ekstraktleri üzerinde yapılan çalışmalar laktik fermentasyonun birçok reaksiyonlarının alkolik fermentasyonla aynı olduğunu göstermiştir. Bu buluş, canlılardaki biyokimyasal olaylarda bir birlik olduğunu ortaya koyan çok önemli bir merhaledir. Glikoliz reaksiyonlarının tamamın 1940'larda aydınlatılmıştır. Bu konuda katkısı olan başlıca biyokimyacılar Gustav Embden, Otto Meyerhof, Carl Neuberg, Jacop Parnas,

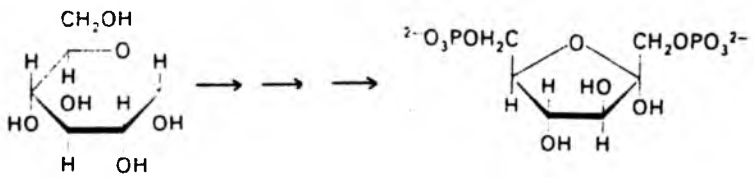
Otto Warburg, Getty Cori ve Carl Cori adlı bilim adamlarıdır.

Glikoliz reaksiyonlarına geçmeden önce glukozun canlılardaki başlıca akibetlerini aşağıdaki şemada gösterelim:



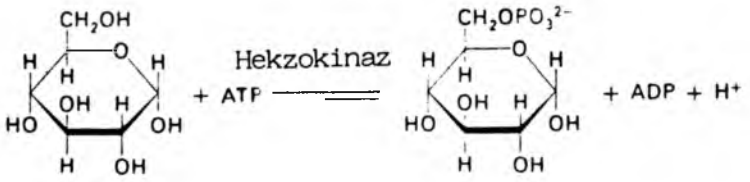
11.2.a. Glikoliz Reaksiyonları

Şimdi glikoliz yolu reaksiyonlarını tek tek inceleyelim. Bu reaksiyonlar hücre sitozolünde vuku bulmaktadır. Glukozun, fruktoz 1,6-difosfata dönüşmesinden ibaret olan ilk safhası bir fosforilasyon, bir izomerleşme ve bir ikinci fosforilasyon reaksiyonlarını kapsamaktadır. Glikolizdeki bu başlangıç reaksiyonlarının hedefi, fosforillenmiş üç karbon birimlerine parçalanmak üzere bir bileşik oluşturmaktır. Müteakiben bu üç karbonlu birimlerden enerji çıkarılmaktadır.



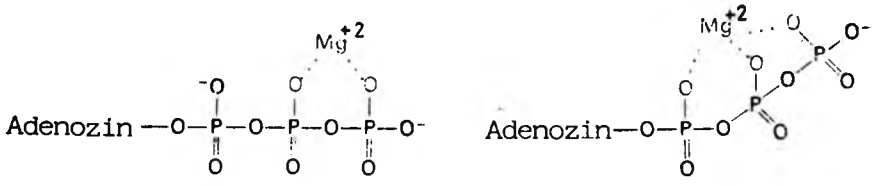
Glukoz Fruktoz 1,6-difosfat

Glukoz birçok hücrelere spesifik bir taşıyıcı veya bir aktif transport sistemi ile girer. Hücreye dahil olan glukozun bir tek akibeti vardır; ATP tarafından fosforillenerek glukoz 6-fosfata çevrilir. ATP'den fosforil grubunun glukozun 6 no'lu karbonuna transferi reaksiyonu hekzokinaz enzimi tarafından katalizlenir.

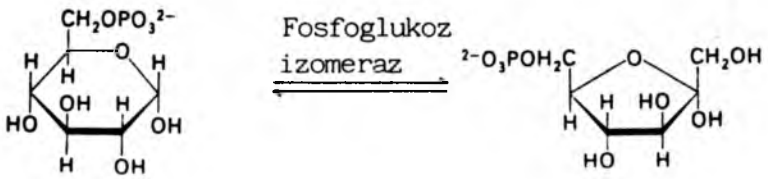


Glukoz Glukoz 6-fosfat

Fosforil transferi biyokimyada temel bir reaksiyondur. ATP'den bir alıcı bileşiğe fosforil transferini gerçekleştiren bir enzime kinaz adı verilir. Hekzokinaz da altı karbonlu şekerler olan muhtelif heksozlara fosforil grubu transfer eden bir enzimdir. Diğer kinazlarda olduğu gibi hekzokinaz da, aktivitesi için Mg^{+2} iyonuna (veya Mn^{+2} gibi bir başka iki değerlikli metal iyonuna) ihtiyaç duyar. Bu metal iyonları aşağıda gösterildiği tarzda ATP ile kompleksler teşkil ederler.

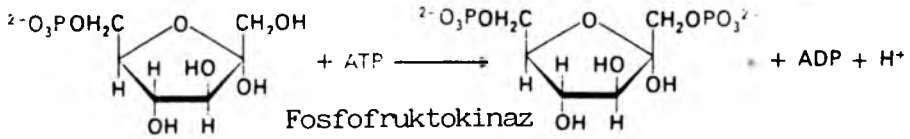


Glikolizin ikinci reaksiyonu glukoz 6-fosfatın fruktoz 6-fosfata izomerleşmesidir. Burada glukoz 6-fosfatın altı atomlu piran halkası, fruktoz 6-fosfatın beş atomlu furan halkasına çevrilmektedir.



Glukoz 6-fosfat Fruktoz 6-fosfat

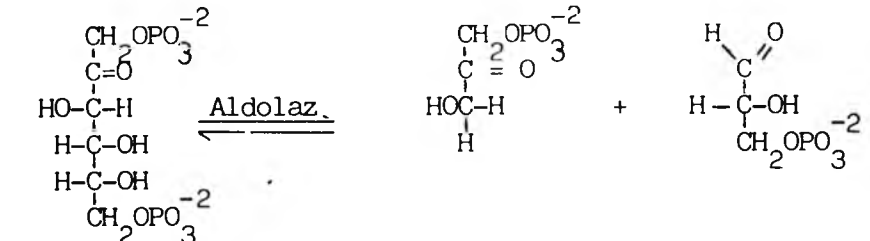
Bu reaksiyonu ikinci bir fosforilasyon basamağı takip eder ve fruktoz 6-fosfat ATP tarafından fruktoz-1,6-difosfata fosforillenir.



Fruktoz 6-fosfat Fruktoz 1,6-difosfat

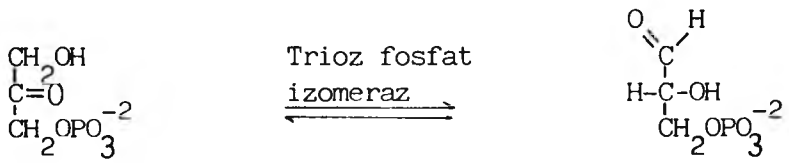
Bu reaksiyon allosterik bir enzim olan fosfofruktokinaz tarafından katalizlenir. İleride de izah edileceği gibi, glikoliz yolunun gidişatı bu enzimin aktivite seviyesiyle yakından alakalıdır.

Glikolizin ikinci safhası dört basamakta cereyan eder. İlk reaksiyonu, fruktoz 1,6-difosfatın aldolaz enzimi katalizörlüğünde gliseraldehid 3-fosfat ve dihidroksiaseton fosfata parçalanmasından ibarettir. Glikolizin bundan sonraki basamakları üç karbonlu bileşikleri ihtiva eder. Aldolaz enzimi ismini, aşağıdaki reaksiyonun tersine yürümesinden almaktadır. Çünkü bu bir aldol kondansasyonudur.

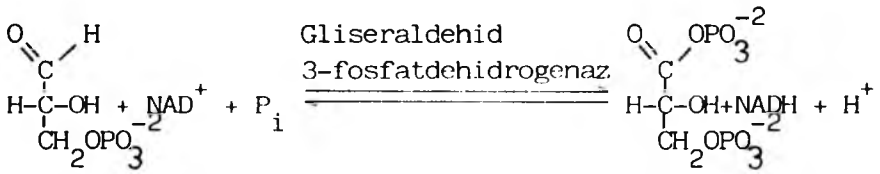


Fruktoz 1,6-difosfat | Dihidroksiaseton fosfat | Gliseraldehid 3-fosfat

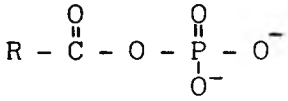
Gliseraldehid 3-fosfat glikoliz yolunun bir ara bileşiği iken, onun izomeri olan dihidroksiaseton fosfat bu yolda doğrudan yer almaz. Fakat dihidroksiaseton fosfat, trioz fosfat izomeraz enziminin katalizörlüğünde hemen gliseraldehid 3-fosfata dönüştürülür. Bu reaksiyon dönüşümlü ve çok hızlıdır. Reaksiyon dengesi % 96 dihidroksiaseton fosfat lehine olmasına rağmen, gliseraldehid 3-fosfatın hemen kullanılması yüzünden reaksiyon sağ tarafa doğru kolayca yürür.



Böylece bir glukoz molekülünden iki molekül gliseraldehid 3-fosfat meydana gelmiş oluyor. Buraya kadarki reaksiyonlarda henüz hiçbir enerji elde edilmemiştir. Bilakis 2 molekül ATP harcanmıştır. Bundan sonraki reaksiyonlar gliseraldehid 3-fosfatın ihtiva ettiği enerjinin açığa çıkarılmasını kapsamaktadır. Bunlardan ilkini gliseraldehid 3-fosfatın, 1,3-difosfogliserata çevrilmesi ve yükseltgenmesi teşkil etmektedir. Bu reaksiyonu gliseraldehid 3-fosfat dehidrogenaz enzimi katalizlemektedir.

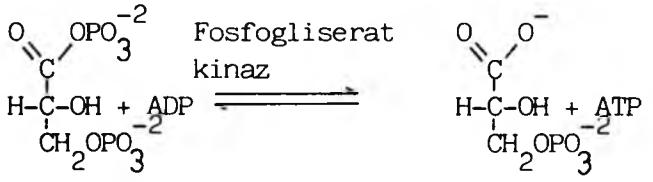


Buradaki redoks reaksiyonu sonucunda yüksek enerjili bir fosfat bağı meydana gelmektedir. 1 no'lu karbondaki aldehid, bir fosforik asid ve bir karboksilik asidin bir karışık anhidridi olan bir açil fosfata çevrilmektedir.



Açil fosfat

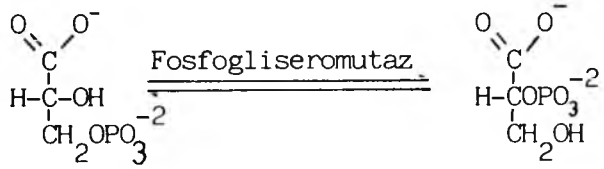
Bundan sonraki basamak, 1,3-difosfogliserattaki yüksek enerjili fosfat bağının ADP ye transferiyle ATP' nin sentezlendiği reaksiyondur.



Fosfogliserat kinaz enzimi tarafından katalizlenen bu reaksiyon substrat seviyesinde ATP'nin sentezlendiği bir basamaktır. Canlı organizmalarda ATP başlıca;(1) substrat seviyesinde fosforilasyon (2) oksidatif fosforilasyon, (3) fotosentetik fosforilasyon olmak üzere 3 yolla sentezlenmektedir. İleride teferruatlı olarak ele alacağımız oksidatif fosforilasyon, mitokondri iç membranındaki elektron transport zinciri vasıtasıyla NADH ve $FADH_2$'daki elektronların O_2'ye iletilmesi esnasında açığa çıkan redoks enerjisinin kemozmotik bir mekanizma ile ATP sentezinde kullanılmasıyla gerçekleşmektedir. Substrat seviyesindeki fosforilasyon ise, reaksiyonlar sonucu ara bileşiklerin üzerinde teşekkül eden yüksek enerjili fosfat bağının ADP'ye transferiyle ATP'nin sentezlenmesidir. İleride bunun iki örneğini daha göreceğiz. Üçüncü ATP sentez yolu, fotosentez konusunda anlatılacaktır.

Şimdi glikoliz yolunun son safhasını inceleyeceğiz. Bu safhadaki üç reaksiyonla 3-fosfogliserat piruvata çevrilmekte ve ikinci bir ATP teşekkül etmektedir. Bu reak-

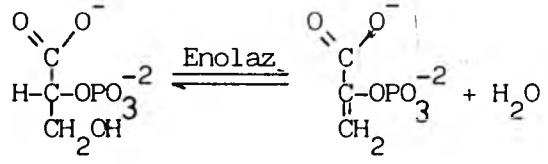
siyonlardan ilki, bir molekül içi düzenlenmedir. Fosfogliseromutaz enzimi katalizörlüğünde 3-fosfogliserat 2-fosfogliserata dönüştürülmektedir. Biyokimyada molekül içinde bir grubun kaydırılmasını katalizleyen enzimlere mutaz adı verilir.



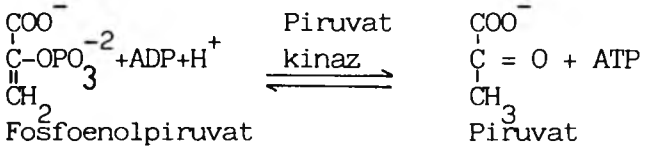
3-Fosfogliserat 2-Fosfogliserat

Bundan sonraki reaksiyon 2-fosfogliseratın dehidrasyonu ile enol teşekkülüdür. Enolaz enziminin katalizlediği bu reaksiyon sonucu, yüksek fosforil transfer potansiyeline sahip bir enol fosfat meydana gelmektedir. Normal bir alkol fosfat esterinin hidrolizlenme ΔG° değeri -3kcal/mol iken, fosfoenolpiruvatınki ise -14,8 kcal/mol civarındadır. Bu artışın sebebi, fosforil grubunun aktarılmasıyla beraber enolün bir ketona yani piruvata dönüşmesidir. Enol ⟶ keton dönüşümünün ΔG° değeri - 10 kcal/mol civarındadır. Görüldüğü gibi fosfoenolpiruvatın yüksek fosforil transferi potansiyeli büyük ölçüde müteakip enol ⟶ keton dönüşümünden kaynaklanmaktadır.

Glikoliz yolunun son reaksiyonu, fosfoenolpiruvatın bir ATP teşekkülü beraberliğinde piruvata dönüştürülmesidir. Bu basamak piruvat kinaz enzimi tarafından katalizlenmektedir. Son iki reaksiyonun denklemi aşağıda verilmiştir.



2-Fosfogliserat Fosfoenolpiruvat



Glikoliz yolunun enerji bilançosunu vermeden önce yukarıda açık formülleriyle sıraladığımız reaksiyon basamaklarını bir tablo üzerinde özetliyelim (Tablo 11.1).

Tablo 11.1. Glikoliz yolu reaksiyonları. Burada ΔG° ve ΔG kcal/mol biriminde olup, ΔG tipik fizyolojik şartlardaki reaktantların bilinen konsantrasyonlarına göre hesaplanan gerçek serbest enerji değişimi, ΔG° ise standart değerdir.

Reaksiyon basamağı	Reaksiyon	Enzim	ΔG°	ΔG
1	Glukoz+ATP ⟶ Glukoz 6-fosfat+ADP+H^+	Hekzokinaz	-4,0	-8,0
2	Glukoz 6-fosfat ⇌ Fruktoz 6-fosfat	Fosfoglukoz izomeraz	+0,4	-0,6
3	Fruktoz 6-fosfat+ATP ⟶ Fruktoz 1,6-difosfat+ADP+H^+	Fosfofruktokinaz	-3,4	-5,3
4	Fruktoz 1,6-difosfat ⇌ Dihidroksiaseton fosfat+ Gliseraldehid 3-fosfat	Aldolaz	+5,7	-0,3
5	Dihidroksiaseton fosfat ⇌ Gliseraldehid 3-fosfat	Trioz fosfat izomeraz	+1,8	+0,6
6	Gliseraldehid 3-fosfat+P_i+NAD^+ ⇌ 1,3-Difosfogliserat+NADH+H^+	Gliseraldehid 3-fosfat dehidrogenaz	+1,5	-0,4
7	1,3-Difosfogliserat+ADP ⇌ 3-Fosfogliserat+ATP	Fosfogliserat kinaz	-4,5	+0,3
8	3-Fosfogliserat ⇌ 2-Fosfogliserat	Fosfogliseromutaz	+1,1	+0,2
9	2-Fosfogliserat ⇌ Fosfoenolpiruvat +H_2O	Enolaz	+0,4	-0,8
10	Fosfoenolpiruvat+ADP+H^+ ⟶ Piruvat+ATP	Piruvat kinaz	-7,5	-4,0

Glikoliz yolunun enerji bilançosu: Bir glukoz molekülünün iki molekül piruvata dönüşümü olayının net reaksiyon denklemi:

$$\text{Glukoz} + 2\text{Pi} + 2\text{ADP} + 2\text{NAD}^{+} \longrightarrow 2\text{Piruvat} + 2\text{ATP} + 2\text{NADH} + 2\text{H}^{+} + 2\text{H}_2\text{O}$$

şeklindedir. Böylece glukozun piruvata dönüştürülmesi sonucu, iki molekül ATP de sentezlenmiş olmaktadır. Glikoliz olayında ATP'nin harcandığı ve sentezlendiği basamaklar Tablo 11.2'de yeralmaktadır.

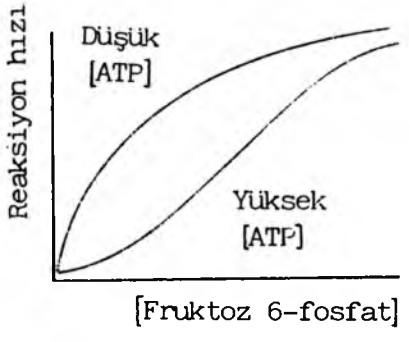
Tablo 11.2. Glikoliz olayında ATP'nin harcandığı ve sentezlendiği reaksiyonlar.

Reaksiyon	Glukoz başına ATP değişmesi
Glukoz ⟶ Glukoz 6-fosfat	-1
Fruktoz 6-fosfat ⟶ Fruktoz 1,6-difosfat	-1
2(1,3-Difosfogliserat ⟶ 3-Fosfogliserat)	+2
2(Fosfoenolpiruvat ⟶ Piruvat)	+2
Toplam:	+2

Glikoliz yolunun kontrol mekanizması: Hayvanlarda glikolizin ikili bir rolü vardır: (1) Glukozu ATP sentezlemek üzere yıkmak, (2) Uzun zincirli yağ asitleri gibi bileşiklerin sentez reaksiyonları için yapı taşları teşkil etmek. Glukozun piruvata çevrilme hızı da hücrenin sözü edilen bu iki ihtiyacını karşılayacak şekilde düzenlenir. Metabolik yollarda dönüşümsüz reaksiyonları katalizleyen enzimler metabolizmanın kontrol noktalarıdır. Glikolizde, hekzokinaz, fosfofruktokinaz ve piruvat kinaz tarafından katalizlenen reaksiyonlar gerçek manada dönüşümsüzdür. Bu yüzden her üç enzim de glikolizin kontrol noktalarını teşkil ederler.

Fosfofruktokinaz glikolizin en önemli kontrol elemanıdır. Dört altbirimden ibaret olan bu tetramerik enzim, yüksek ATP seviyesinde inhibe edilir ve enzimin

fruktoz 6-fosfata afinitesi azalır. Yüksek bir ATP konsantrasyonu fruktoz 6-fosfat için hiperbolik karakterde olan bağlanma eğrisini sigmoid şekle sokar (Şekil 11.1). Bu allosterik etki katalitik bölgenin uzağında yer alan oldukça spesifik bir düzenleyici bölgeye bağlanmakla gerçekleştirilir. ATP'nin inhibisyon etkisi AMP tarafından önlenir ve enzim aktivitesi ATP/AMP oranının düşmesiyle tekrar artar. Diğer bir deyişle glikoliz, hücrenin enerji yükü azaldığında yeniden uyarılır. Önceden de söylediğimiz gibi glikoliz yolu vasıtasıyla biyosentez için kullanılacak karbon iskeletleri de üretilir ve bu yüzden fosfofruktokinazın, yapı taşlarının bolluğu veya azlığına göre de düzenlenmesi beklenir. Gerçekten bu enzim, sitrik asit devrinin ilk ara bileşiği olan sitrat tarafından inhibe edilir. Yüksek bir sitrat seviyesi biyosentetik ön maddelerinin bol olduğuna bir işaret mahiyetini gösterir ve bu maksatla glukozun yıkımına ihtiyaç olmadığını bildirir. Sitrat, ATP'nin inhibisyon etkisini kuvvetlendirir. Enzim, hücrenin enerji veya karbon iskeleti ihtiyacı durumunda oldukça aktiftir. Her ikisinin de bol olduğu şartlarda glikoliz olayı hemen hemen durur.



Şekil 11.1. Fosfofruktokinazın allosterik kontrolü: Yüksek ATP konsantrasyonu enzimin fruktoz 6-fosfata olan ilgisini azaltır. AMP, ATP'nin inhibisyon etkisini azaltırken sitrat da artırır.

Hekzokinaz ve piruvat kinaz da glikoliz hızını kontrol eden faktörlerdir. Kas ve karaciğerden elde edi-

len piruvat kinaz, ATP tarafından allosterik olarak inni be edilir ve böylece yüksek enerji yükü durumunda fosfoenolpiruvatın piruvata çevrilmesi bloke edilir. Hekzokinaz da, glukoz 6-fosfat tarafından allosterik olarak inhibe edilir. Fosfofruktokinaz bloke edildiği zaman, hücrede glukoz 6-fosfat konsantrasyonu yükselir ve hekzokinaz otomatikman inhibe edilir. Fakat karaciğerde yüksek glukoz 6-fosfat seviyelerinde de glukoz fosforillenerek glukoz 6-fosfata çevrilir. Bu işi hekzokinazdan farklı bir enzim olan glukokinaz enzimi gerçekleştirir. Bu enzimin glukoz için K_M değeri hekzokinazdan daha büyüktür. Bu yüzden glukokinaz yüksek glukoz konsantrasyonunda etkili olabilir. Bu enzimin görevi glukozun depolanma şekli olan glikojen sentezi için glukoz 6-fosfat sağlamaktır.

Fosfofruktokinaz glikoz hızını belirlemekte niçin hekzokinazdan daha etkilidir? Bu sorunun cevabı, glukoz 6-fosfatın yalnız glikoliz ara bileşiği olarak değil de, glikojen sentezi ve pentoz fosfat yolu için de lüzumlu olmasının altında yatmaktadır.

11.2.b. Glukoz Dışındaki Diğer Monosakkaritlerin Glikolize Girişi

İnsan gıdasındaki karbohidratların önemli bir kısmı **fruktoz**dan ibarettir. Fruktoz, günde ortalama 100 gram kadar serbest şeker veya sakkarozun bileşeni halinde diyetle alınır. Sindirim yoluyla ince bağırsaklardan kana karışan fruktozun büyük bir kısmı, karaciğerde fruktoz 1-fosfat metabolik yolunda metabolize edilir. Bu yolun ilk basamağı fruktozun 1 no'lu karbonunun fruktokinaz vasıtasıyla fosforilasyonudur.

$$\text{D-Fruktoz} + \text{ATP} \xrightarrow{Mg^{+2}} \text{D-Fruktoz 1-fosfat} + \text{ADP} + H^+$$

Meydana gelen fruktoz 1-fosfat, daha sonra aldolaz vasıtasıyla D-gliseraldehid ve dihidroksiaseton fosfata parçalanır.

D-Fruktoz 1-fosfat ⟶ D-Gliseraldehid+Dihidroksiaseton fosfat

Burada oluşan serbest D-gliseraldehid, trioz kinaz vasıtasıyla gliseraldehid 3-fosfata fosforillenir.

D-Gliseraldehid+ATP ⟶ D-Gliseraldehid 3-fosfat+ADP

Böylece oluşan dihidroksiaseton fosfat ve gliseraldehid 3-fosfat glikolizin ara ürünleri olarak piruvata kadar yıkılırlar.

Fruktoz, hekzokinaz vasıtasıyla da fruktoz 6-fosfata fosforillenebilir:

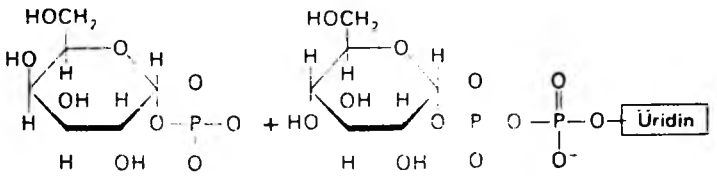
$$\text{D-Fruktoz+ATP} \xrightarrow{Mg^{+2}} \text{D-Fruktoz 6-fosfat+ADP+}H^{+}$$

Ancak hekzokinazın glukoza ilgisi fruktozdan 20 kat daha büyüktür. Karaciğerde glukoz seviyesi yüksek olduğundan, fruktozun fruktoz 6-fosfata dönüşümü çok az miktarda gerçekleşir. Fakat yağ dokusunda fruktoz seviyesi glukozdan çok daha yüksek olduğundan, fruktozun büyük kısmı fruktoz 6-fosfat üzerinden metabolize edilir.

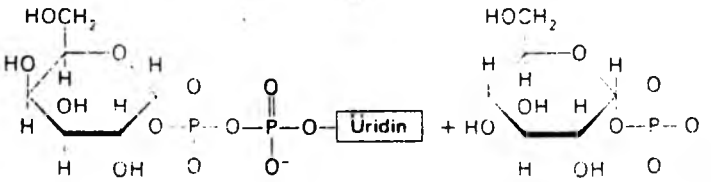
Glikolize giren diğer bir monosakkarit olan **galaktoz**, sütün ana karbohidratı olan laktozun hidroliziyle meydana gelir. Galaktoz, 4 basamakta glukoz 6-fosfata dönüşür. İlk basamakta galaktoz, galaktokinaz vasıtasıyla galaktoz 1-fosfata fosforillenir:

D-Galaktoz+ATP ⟶ D-Galaktoz 1-fosfat+ADP+H^{+}

İkinci basamakta galaktoz 1-fosfat uridiltransferaz tarafından katalizlenen aşağıdaki reaksiyonla UDP-galaktoz meydana gelir:

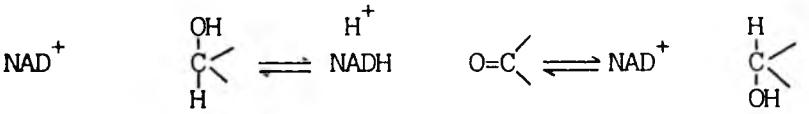


Galaktoz 1-fosfat + UDP-Glukoz



UDD-Galaktoz + Glukoz 1-fosfat

Daha sonra UDP-galaktoz, UDP-galaktoz-4-epimeraz vasıtasıyla UDP-glukoza dönüşür. NAD^+ bu basamakta koenzim olarak görev yapar. Fluoresans araştırmaları, NAD^+'nın şekerin 4 no'lu karbonuna bağlı hidrojen atomunu üzerine alarak bir 4-keto şeker ara ürünü oluşturduğunu ve daha sonra NADH tekrar hidrojenini 4 no'lu karbonun diğer tarafına aktararak epimerini meydana getirdiğini göstermiştir.



UDP-Galaktoz (sadece 4 no'lu C verilmiş) — 4-Keto ara ürünü — UDP-Glukoz

Böylece 2. basamakta kullanılan UDP-glukoz tekrar kazanılmış olur. Son basamakta glukoz 1-fosfat fosfoglukomutaz vasıtasıyla glukoz 6-fosfata dönüşür ve bu da glikolize dahil olur.

Tabii gıdalarda mevcut çeşitli polisakkaritler ve glikoproteinlerin sindiriminden ortaya çıkan **D-mannoz**, 6 pozisyonunda hekzokinaz vasıtasıyla fosforillenir.

D-Mannoz+ATP ⟶ D-Mannoz 6-fosfat+ADP

Oluşan D-mannoz 6-fosfat mannozfosfat izomeraz beraberliğinde dönüşümlü olarak bir glikoliz ara ürünü olan fruktoz 6-fosfata izomerize edilir:

D-Mannoz 6-fosfat ⇌ D-Fruktoz 6-fosfat

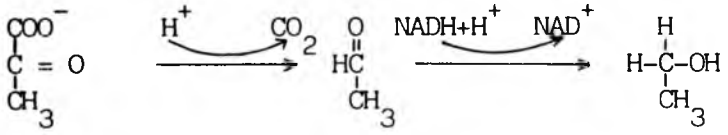
11.2.c. Piruvatın Etanol, Laktat ve Asetil CoA'ya Çevrilmesi

Glukozun piruvata çevrilmesini gerçekleştiren reaksiyon serisi bütün organizmalarda ve her çeşit hücrede hemen hemen aynıdır. Bunun aksine metabolik enerjinin elde edilmesi için piruvatın daha sonraki akibeti farklılık arzetmektedir. Şimdi piruvatın maruz kaldığı üç metabolik yolu özetleyelim:

1) Maya hücrelerinde ve bazı mikroorganizmalarda piruvattan etanol yapılır.Bu dönüşümün ilk reaksiyonu piruvatın dekarboksilasyonudur.

$$\text{Piruvat} + H^+ \longrightarrow \text{Asetaldehid} + CO_2$$

Bu reaksiyon koenzim olarak tiamin pirofosfat (TPP) ihtiva eden piruvat dekarboksilaz enzimi tarafından katalizlenir. TPP birçok karboksilaz enzimlerinde koenzim fonksiyonu görür. İkinci reaksiyon ise asetaldehidin etanole indirgenmesidir. Bu reaksiyon aktif bölgesinde Zn^{+2} ve koenzim olarak NAD^+ ihtiva eden alkol dehidrogenaz tarafından katalizlenmektedir.



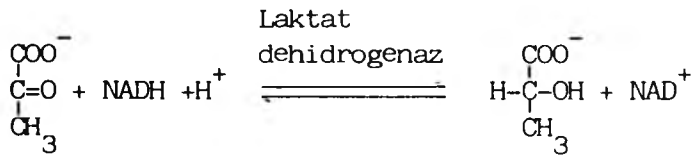
Piruvat Asetaldehid Etanol

Glukozun etanole çevrilmesi olayına alkolik fermentasyon adı verilir. Bu anaerobik prosesin net reaksiyonu şöyledir:

$$Glukoz + 2Pi + 2ADP + 2H^+ \longrightarrow 2Etanol + 2CO_2 + 2ATP + 2H_2O$$

Burada NAD^+ ve NADH'ın bulunmadığı görülmektedir. Asetaldehidin etanole indirgenmesiyle NAD^+, gliseraldehid 3-fosfat dehidrogenaz enzimi tarafından katalizlenen reaksiyonda kullanılmak üzere tekrar oluşmaktadır.

2)Birçok mikroorganizmalar ve eksersiz halindeki kaslarda olduğu gibi, yeterli oksijeni bulamayan bazı yüksek organizma hücrelerinde piruvat laktata çevrilir. Piruvatın NADH tarafından indirgenerek laktatın teşekkülü, laktat dehidrogenaz enzimi tarafından katalizlenir.



Piruvat Laktat

Glukozun, laktata çevrilmesi reaksiyonları net denklemi şöyledir:

$$Glukoz + 2Pi + 2ADP \longrightarrow 2Laktat + 2ATP + 2H_2O$$

Aynen alkolik fermentasyonda olduğu gibi net bir redoks olayı yoktur. Gliseraldehid 3-fosfat yükseltgenmesinde ortaya çıkan NADH, piruvatın indirgenmesinde kullanılmıştır. Bu indirgenme sonucu ortaya çıkan NAD^+ yine anaerobik şartlarda glikolizin devamını sağlar. Eğer NAD^+, etanol veya laktat teşekkülü ile rejenere edilmezse glikoliz olayı gliseraldehid 3-fosfattan ileri yürüyemez ve daha ATP sentezlenemez. Bir bakıma piruvatın laktata çevrilmesiyle organizma zaman kazanır. Oluşan laktat karaciğerde glukoneogenez ile tekrar glukoz ve glikojene çevrilir. Bir manada da kas yükünün bir bölümü karaciğere devredilir.

3) Glukoz bünyesinde bulunan enerjinin yalnız küçük bir bölümü laktat veya etanole çevrilme esnasında açığa çıkar. Sitrik asit ve elektron transport zinciri vasıtasıyla aerobik olarak daha fazla enerji elde edilebilir. Bu oksidatif yola giriş asetil CoA iledir. Asetil CoA, piruvatın mitokondri içinde oksidatif dekarboksilasyonu ile teşekkül eder:

$$Piruvat + NAD^+ + CoA \longrightarrow Asetil\ CoA + CO_2 + NADH$$

Piruvat dehidrogenaz enzim kompleksi tarafından katalizlenen bu reaksiyon sitrik asit devrinde daha geniş olarak anlatılacaktır. Bu reaksiyon ve gliseraldehid 3-fosfat oksidasyonu için gerekli olan NAD^+, NADH'ın mitokondrideki elektron transport zinciri vasıtasıyla elektronlarını O_2'ye aktarması sonucu rejenere edilir.

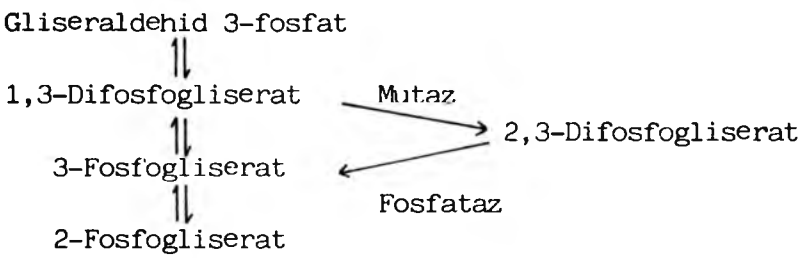
11.2.d. 2,3-Difosfogliseratın (2,3-DPG) O_2 Taşınmasındaki Rolü

2,3-Difosfogliserat, eritrositlerdeki O_2 taşınmasında düzenleyici bir role sahiptir. Hemoglobinin oksijen afinitesi, oksijensiz halinin stabilize edilmesiyle azaltılır. Kırmızı kan hücreleri 4mM gibi yüksek konsantrasyonda 2,3-DPG ihtiva ederlerken (Tablo 11.3), diğer birçok hücrelerde eser miktarda bulunur. 2,3-DPG, 3-fosfogliseratın, fosfogliserat mutaz enzimi katalizörlüğünde 2-fosfogliserata dönüştürülmesinde kofaktör olarak genel bir role sahiptir.

Tablo 11.3. Eritrositlerde glikoliz yolu ara bileşiklerinin yaklaşık konsantrasyonları.

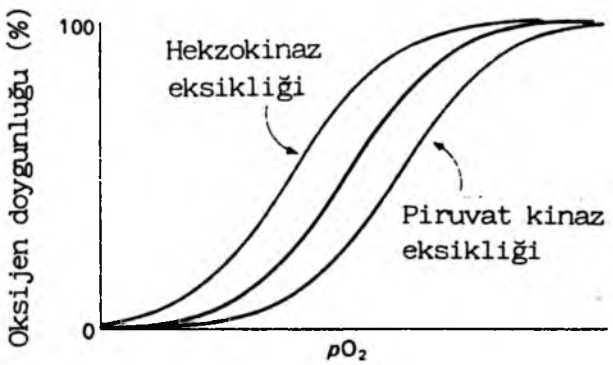
Ara ürün	μM	Ara ürün	μM
Glukoz	5000	3-Fosfogliserat	118
Glukoz 6-fosfat	83	2-Fosfogliserat	30
Fruktoz 6-fosfat	14	Fosfoenolpiruvat	23
Fruktoz 1,6-difosfat	31	Piruvat	51
Dihidroksiaseton fosfat	138	Laktat	2900
Gliseraldehid 3-fosfat	19	ATP	1850
1,3-Difosfogliserat	1	ADP	138
2,3-Difosfogliserat	4000	P_i	1000

2,3-DPG'nin sentez ve yıkımı glikoliz dışında bazı yan reaksiyonlar vasıtasıyla gerçekleştirilir.



Difosfogliserat mutaz, 1,3-DPG'yi, 2,3-DPG'ye çevirir. 2,3-DPG de 3-fosfogliserata 2,3-difosfogliserat fosfataz enzimi katalizörlüğünde hidrolizlenir. Fosfat esterlerini parçalayan enzimlere fosfataz adı verilir.

Eritrositlerdeki glikoliz ve oksijen taşınması birbirine 2,3-DPG ile bağlantılıdır. Bu yüzden glikoliz yolundaki bir arıza oksijen transportunu etkileyecektir. Gerçekten kırmızı kan hücrelerinde irsi glikoliz yolu bozukluğuna sahip bazı hastalara ait kan oksijen ayrışma eğrilerinde bazı değişmelere rastlanmıştır(Şekil 11.2).



Şekil 11.2. Normal (ortadaki eğri), hekzokinaz ve piruvat kinaz yetersizliğine sahip kırmızı kan hücrelerinin oksijen ayrışma eğrileri.

Hekzokinaz yetersizliğinde glikoliz ara ürünlerinin konsantrasyonu düşük bulunur, çünkü ilk reaksiyon basamağı olan glukoz fosforillenmesi bozulmuştur. Bunun sonucu düşük 2,3-DPG seviyesi hemoglobinin anormal yükseklikte

oksijen afinitesine sebep olur. Bu olayın tam tersi piruvat kinaz yetersizliğinde görülür. Son basamağın inhibisyonu yüzünden 2,3-DPG'nin konsantrasyonu normalin yaklaşık iki misline çıkar. Bu da düşük oksijen afinitesine yol açar. 2,3-DPG'nin oksijen transportundaki düzenleyici rolü bilinmeden önce hekzokinaz ve piruvat kinaz enzimleri yetersizliğindeki anormal O_2 ayrışma eğrileri açıklanamıyordu.

11.3. SİTRİK ASİT DEVRİ (TCA DEVRİ)

Bundan önce incelediğimiz glikoliz olayında glukoz, iki adet piruvat molekülüne çevrilmiştir. Aerobik şartlarda glukozdan enerji üretiminin müteakip basamağı, piruvatın oksidatif dekarboksilasyonu ile asetil CoA'ya dönüştürülmesidir. Bu aktifleşmiş asetil birimi, mitokondri matriksinde cereyan eden bir seri reaksiyonla CO_2'ye kadar tamamen oksitlenir. Bu reaksiyon serisine sitrik asit devri, trikarboksilik asit devri (TCA devri) veya Krebs devri adı verilir. Sitrik asit devri, amino asitler, yağ asitleri ve karbohidratlar gibi yakıt bileşikleri oksidasyonunun en son müşterek yoludur. Bunların birçoğu devire asetil CoA olarak girerler. TCA devri aynı zamanda biyosentezde kullanılan ara bileşikleri de sağlar.

11.3.a. Piruvat Dehidrogenaz Kompleksi: Bir Multienzim Sistemi

Glikoliz ile TCA devri arasındaki bağlantı mitokondri matriksinde piruvatın, asetil CoA'ya dekarboksilasyonla çevrilmesi sonucu kurulmaktadır:

$$\text{Piruvat} + \text{CoA} + \text{NAD}^+ \longrightarrow \text{Asetil CoA} + CO_2 + \text{NADH}$$

Glikoliz ürünü olan piruvatın sitrik aside dönüşümsüz olarak aktarılmasını sağlayan bu reaksiyonun piruvat dehidrogenaz enzim kompleksi tarafından katalizlendiğini daha önceden belirtmiştik. Bu enzim kompleksi üç çeşit enzimin organize bir topluluğudur (Tablo 11.4). Yukarıda

denklemini verdiğimiz reaksiyon, stokiyometresinde görüldüğünden çok daha karmaşıktır. CoA ve NAD^+ gibi denklemde yer alan kofaktörlerin yanısıra, prostetik grup olarak tiamin pirofosfat (TPP), lipoamid ve FAD koenzimlerini de ihtiva eder.

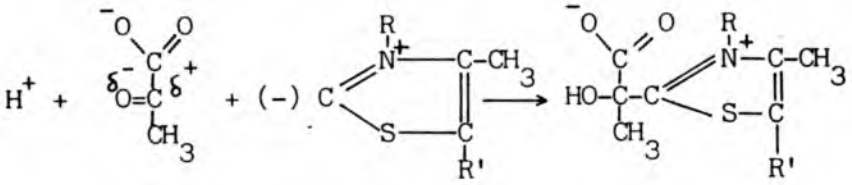
Tablo 11.4. E.coli'nin piruvat dehidrogenaz kompleksi.

Enzim	Zincir sayısı	Prostetik grup	Katalizlediği reaksiyon
Piruvat dehidrogenaz birimi(E_1)	24	TPP	Piruvatın dekarboksilasyonu
Dihidrolipoil transasetilaz (E_2)	12	Lipoamid	2 nolu C'nun oksidasyonu ve CoA'ya transferi
Dihidrolipoil dehidrogenaz (E_3)	12	FAD	Lipoamidin yükseltgenmiş formunun tekrar teşekkülü

Piruvatın asetil CoA'ya çevrilmesi dört basamakta gerçekleştirilir. Önce Piruvat TPP ile birleşerek dekarboksile olur. Bu reaksiyon, multienzim kompleksinin piruvat dehidrogenaz bileşeni tarafından kataliz edilir.

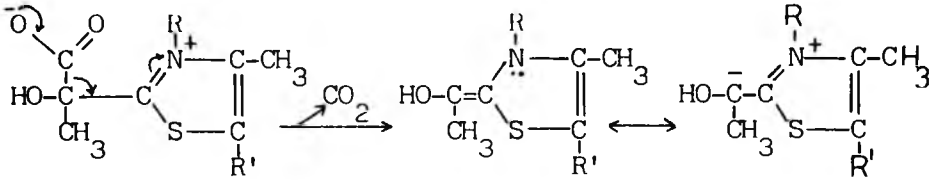
$$\text{Piruvat} + \text{TPP} \longrightarrow \text{Hidroksietil-TPP} + CO_2$$

TPP'nin en mühim özelliği tiyazol halkasındaki N ve S atomları arasındaki karbon atomunun çok asidik olmasıdır (Şekil 9.1). Bu karbon üzerindeki hidrojen ayrışarak piruvatın karbonil grubu reaktif karbona katılır.



Piruvat TPP karbanyonu Katılmış bileşik

TPP'nin pozitif yüklü azotu, negatif yük teşekkülünü stabilize etmek için bir elektron kuyusu olarak hareket ederek dekarboksilasyon gerçekleştirilir. Protonlaşma sonucu hidroksietil-TPP oluşur.



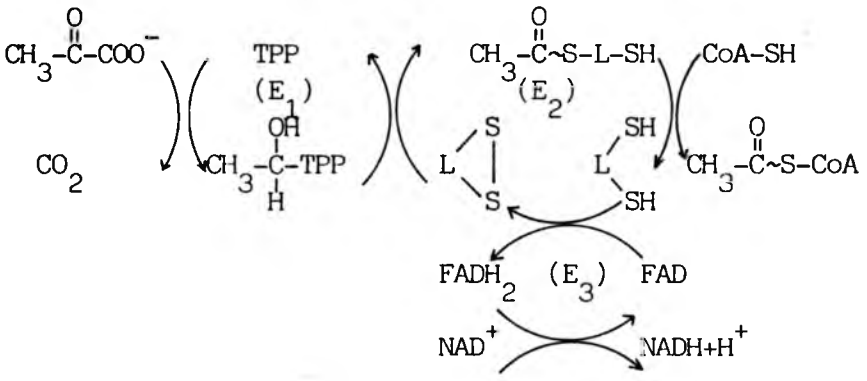
Hidroksi etil-TPP

İkinci basamak reaksiyonda, TPP'ye bağlı hidroksietil oksitlenerek asetil grubu halinde lipoamide aktarılır. Buradaki yükseltgeyici, daha sonra sülfhidrile dönüştürülen lipoamid disülfit grubudur. Bu reaksiyon multienzim kompleksinin bir kısmı olan dihidrolipoil transasetilaz enzimi tarafından kataliz edilir. Sonunda asetillipoamid hasıl olur (Şekil 9.13).

Üçüncü basamakta asetil grubu CoA'ya aktarılarak asetil CoA hasıl olur. Bu reaksiyon da dihidrolipoil transasetilaz tarafından katalizlenir. Burada yüksek enerjili tiyoester bağı asetil CoA'da korunur.

Dördüncü reaksiyon basamağında lipoamidin okside hali tekrar kazanılarak reaksiyon tamamlanır. Bu reaksiyonda yükseltgeyici NAD^+ olup, olay dihidrolipoil dehidrogenaz tarafından katalizlenir. FAD, bu enzimin prostetik grubudur.

Şimdi bu karmaşık reaksiyonu aşağıdaki şema ile özetleyelim:

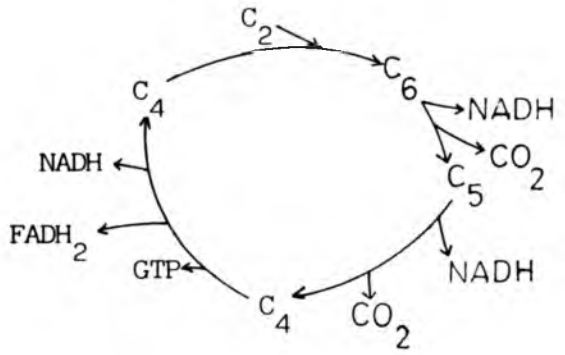


Üç çeşit enzimin yapı olarak içiçe organizasyonu bu karışık reaksiyonun koordineli olarak katalizine fırsat vermektedir. Bu reaksiyonun bütün ara bileşikleri komplekse sıkıca bağlı olarak bir enzimden diğerine aktarılmaktadır.

Bu enzim kompleksi hakkında aydınlatıcı bilgiler Lester Reed'in E.coli enzimi üzerindeki çalışmaları sonucu ortaya konulmuştur. Bu organizmanın piruvat dehidrogenaz multienzim kompleksi yaklaşık 4.600.000 dalton molekül ağırlığında ve 48 alt birimden ibarettir. 300 A°'u bulan çapıyla kompleksin polihedral yapısı elektron mikroskopu ile gözlenebilmektedir. Transasetilaz polipeptid zincirleri kompleksin çekirdeğini oluştururken diğer birimler bunlara bağlı haldedir.

11.3.b. TCA Devri Reaksiyonları

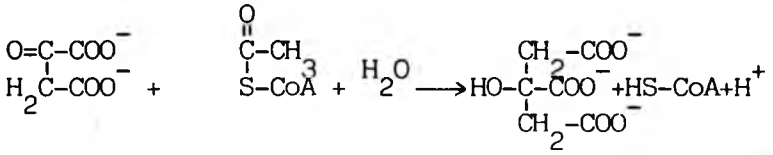
Yukarıda enzimini ve mekanizmasını etraflıca anlattığımız reaksiyon sonucu teşekkül eden asetil CoA, sitrik asit devrine girer. Bu devrin reaksiyon ve enzimlerini tek tek incelemeden önce, bu devirdeki olayları kısaca ve şematik olarak gözden geçirelim:



Burada dört karbonlu bir bileşik (okzalasetat) ile iki karbonlu bir asetil birimi kondanse olarak, altı karbonlu bir trikarboksilik asit (sitrat) meydana getirirler. Bu da dekarboksile olarak, beş karbonlu (α-ketoglutarat) bir bileşik hasıl olur ve bunun da oksidatif dekarboksilasyonu ile dört karbonlu dikarboksilik asit (süksinat) meydana gelir. Daha sonra süksinat çeşitli oksidasyon basamaklarından geçerek tekrar okzalasetata çevrilerek devir tamamlanır. Bu suretle asetil birimi halinde devire dahil olan iki karbon, iki adet CO_2 halinde devirden ayrılır. Asetil grubu iki CO_2'ye nazaran daha indirgenmiş olduğundan, sitrik asit devrinde muhtelif indirgenme-yükseltgenme reaksiyonları vuku bulmaktadır. Gerçekten bu manada dört reaksiyon olmaktadır. Üç hidrür iyonu (H^-), beraberindeki ikişer elektronla üç tane NAD^+'ye transfer olurken, iki hidrojen atomu da iki elektronla beraber FAD'ye aktarılır. Burada teşekkül etmiş olan 3 NADH ve $FADH_2$ elektron transport zincirinde O_2 tarafından oksitlenirken 11 molekül ATP meydana getirirler. Bunun yanısıra bir devirde, yüksek enerjili fosfat bağına sahip bir de GTP sentezlenir.

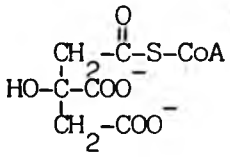
Şimdi sitrik asit devrinin reaksiyonlarını enzimleriyle beraber tek tek inceleyelim:

Siklüs, okzalasetatın, asetil CoA'nın asetil grubuyla birleşme reaksiyonu ile başlar. Bu bir hidroliz olayını ihtiva ettiğinden bir H_2O molekülü de kullanılır:



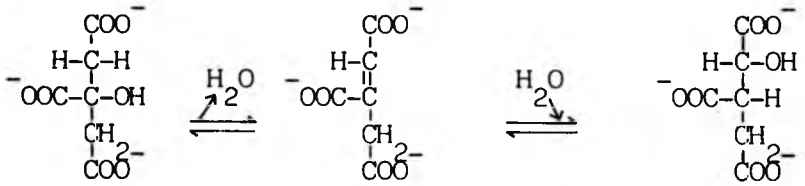
Okzalasetat Asetil CoA Sitrat

Bir aldol kondansasyonunu hidrolizin takip ettiği bu reaksiyon, sitrat sentaz enzimi tarafından katalizlenir. Önce okzalasetat, asetil CoA ile kondanse olarak sitril CoA oluşturur, bu da sitrat ve CoA'ya hidroliz olur.



Sitril CoA

İkinci reaksiyon, sitratın önce bir dehidrasyon, akabinden de bir hidrasyon olayı ile izositrata dönüştürülmesidir. Bunun sonucu olarak molekül karbon atomları arasında H ve OH değişimi hasıl olur. Her iki basamağı da katalizleyen enzime, ara bileşik cis-akonitatdan dolayı akonitaz adı verilir.



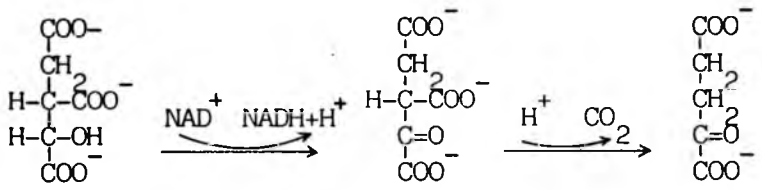
Sitrat cis-Akonitat İzositrat

Üçüncü basamak ise, TCA devrinin ilk redoks reaksiyonudur:

İzositrat+NAD^+ $\rightleftharpoons$ α-Ketoglutarat+CO_2+NADH

İzositratın α-ketoglutarata oksidatif dekarboksilasyonu,

izositrat dehidrogenaz enzimi tarafından katalizlenir. Bu reaksiyonun ara bileşiği okzalsüksinat olup, enzime bağlı iken hemen CO_2 ve ∝-ketoglutarata parçalanır.



İzositrat Okzalsüksinat ∝-Ketoglutarat

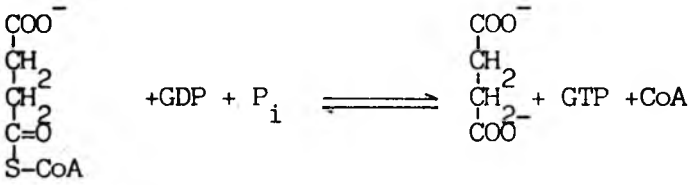
∝-Ketoglutaratın teşekkül hızı ileride ayrıntılı olarak anlatacağımız gibi, siklüsün toplam hızını belirlemede önemli bir role haizdir. Hücrelerde iki çeşit izositrat dehidrogenaz enzimi vardır. Bunlardan birisi NAD^+'yi, diğeri de $NADP^+$'yi koenzim olarak kullanır. Sitrik asit devrinde önemli olan NAD^+'li enzim mitokondride yer alırken, $NADP^+$-spesifik enzim hem mitokondri, hem de sitozolde bulunur ve farklı bir metabolik role sahiptir.

TCA siklüsünün dördüncü reaksiyonu, ∝-ketoglutaratın oksidatif dekarboksilasyonu ile süksinil CoA'ya çevrilmesidir:

$$\text{∝-Ketoglutarat} + NAD^+ + \text{CoA} \rightleftharpoons \text{Süksinil CoA} + CO_2 + NADH$$

Bu reaksiyon, üç çeşit enzimin yer aldığı organize bir yapıya sahip ∝-ketoglutarat dehidrogenaz multienzim kompleksi tarafından katalizlenir. Bu reaksiyon mekanizması, piruvatın asetil CoA'ya çevrilmesine çok benzemektedir. Aynı kofaktörler kullanılır: NAD^+, CoA, TPP, lipoamid ve FAD. Gerçekten piruvat dehidrogenaz ve ∝-ketoglutarat dehidrogenaz multienzim komplekslerinin birçok ortak yapısal özellikleri de vardır.

Beşinci basamakta ise, süksinil CoA sentetaz enzimi tarafından katalizlenen aşağıdaki reaksiyon yer alır:



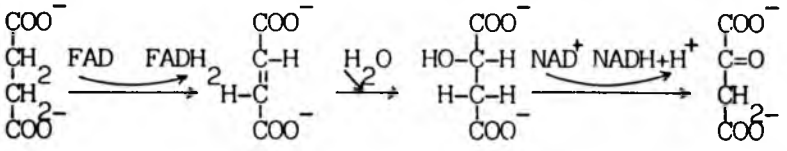
Süksinil-CoA Süksinat

Süksinil-CoA'daki tiyoester bağı enerjice zengin bir bağdır ve hidroliz ΔG° değeri -8 kcal/mol'dur. Bu tiyoester bağının parçalanması guanozin difosfatın fosforillenmesiyle beraber yürür. GTP'deki fosforil grubu kolayca ADP'ye aktarılarak ATP sentezlenir.

$$GTP + ADP \rightleftharpoons GDP + ATP$$

şeklinde gösterilen bu transfer reaksiyonu nükleosit difosfokinaz enzimi tarafından katalizlenir. Süksinil CoA'dan yüksek enerjili bir fosfat bağının teşekkülü, substrat seviyesinde fosforilasyona bir örnektir.

Sitrik asit devrinin bundan sonraki üç reaksiyonu, dört karbonlu süksinatın oksidasyon, hidrasyon ve ikinci bir oksidasyon basamaklarıyla yine dört karbonlu okzalasetata dönüştürülmesidir. Bu reaksiyonlar TCA devrinin son safhasını teşkil eder.



Süksinat Fumarat Malat Okzalasetat

Süksinatın fumarata oksidasyonu süksinat dehidrogenaz enzimi tarafından katalizlenir. Burada hidrojen alıcısı NAD^+ yerine FAD'dir, çünkü bu reaksiyonun serbest enerjisi NAD^+'yi indirgemeye kafi değildir. Bu tip reaksiyonlarda elektron alıcısı olarak umumiyetle FAD rol alır.

Süksinat dehidrogenazda, FAD'nin izoalloksazin halkası enzimin bir histidin yan grubuna kovalent bağlandığından enzim E-FAD şeklinde gösterilebilir.

Süksinat dehidrogenaz FAD'nin yanısıra 4 adet Fe ve dört adet de inorganik kükürt (S) ihtiva eder. Demir atomları muhtemelen inorganik kükürt atomlarına bağlıdır. Bu tipteki bir protein, demir-kükürt(FeS) proteini veya hem (demir ihtiva eden porfirin halkası, hemoglobindeki gibi) yapısında olmayan demirli protein adını alır. Bu proteinler mitokondri ve kloroplastların elektron taşıyıcı sistemlerinde önemli bir rol oynarlar. Süksinat dehidrogenaz, birisi FAD ve iki FeS kümesi ihtiva eden 70 kdal molekül ağırlığında, diğeri de 27 kdal ağırlığında ve tek bir FeS kümesi taşıyan iki alt birimden ibarettir. Bu enzim iç mitokondri zarının bir integral proteini olarak da TCA devrinin diğer enzimlerinden ayrılır. Gerçekten süksinat dehidrogenaz elektron transport zincirine direkt bağlıdır. $FADH_2$ teşekkül ettiği zaman NADH gibi enzimden ayrılmaz ve yapısındaki iki elektronu doğrudan enzimdeki Fe^{+3} atomlarına aktarır.

Fumaratın L-malata hidrasyonu, fumaraz enzimi tarafından katalizlenirken, H ve OH stereospesifik olarak trans halde katılarak yalnız L-malat izomerinin teşekkülü gerçekleştirilir.

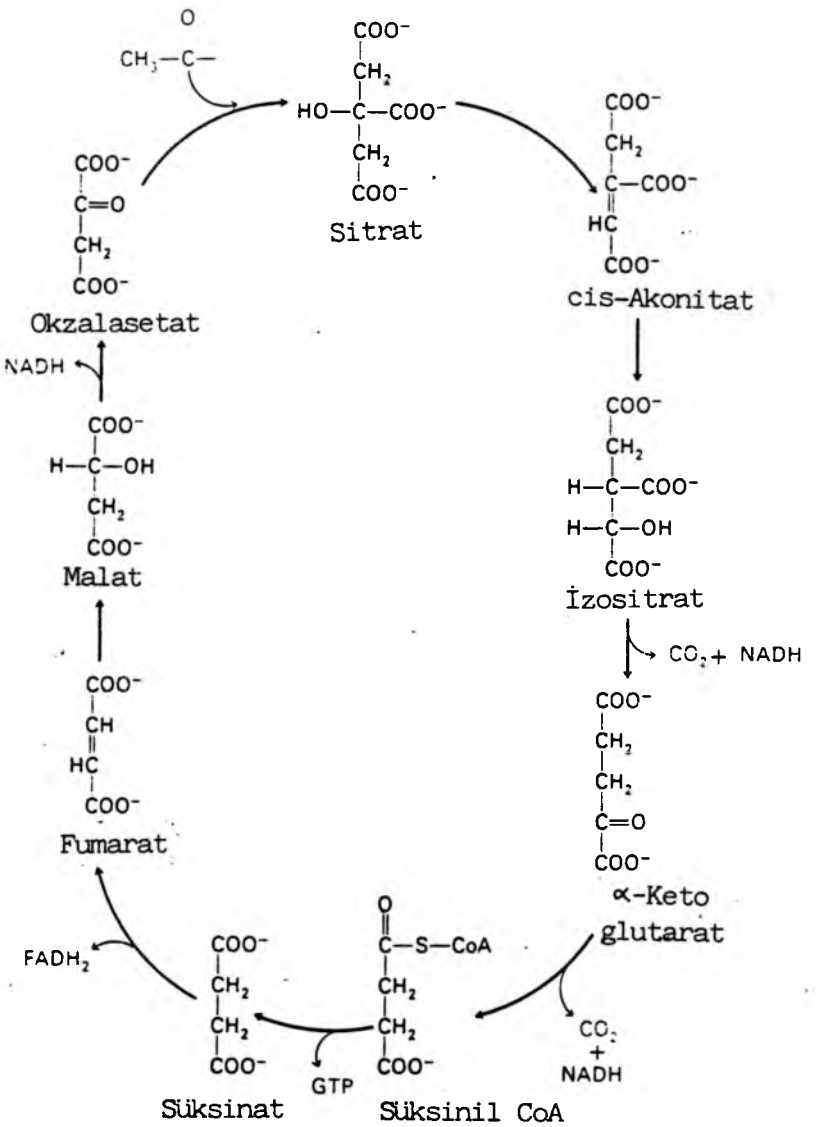
Son olarak malatın okzalasetata yükseltgenmesi reaksiyonu, malat dehidrogenaz enzimi katalizörlüğüyle ve NAD^+ elektron alıcısı beraberliğinde tahakkuk eder:

$$\text{Malat}+NAD^+ \rightleftharpoons \text{Okzalasetat} + NADH+H^+$$

Şimdi TCA devrinin stokiyometrik denklemini verelim:

$$\text{Asetil CoA}+3NAD^+ + FAD + GDP + P_i + 2H_2O \longrightarrow 2CO_2 + 3NADH + FADH_2 + GTP + 2H^+ + CoA$$

Bu stokiyometrik eşitliği veren TCA devrinin bütün reaksiyonları Tablo 11.5 ve Şekil 11.3'de özetlenmiştir.



Şekil 11.3. Sitrik asit devri reaksiyonları.

Tablo 11.5. Sitrik asit devri reaksiyonları.

Reaksiyon	Enzim	Kofaktör	ΔG°
1. Asetil CoA+Okzalasetat $+H_2O \longrightarrow$ Sitrat+CoA+H^+	Sitrat sentaz	CoA	-7,5
2. Sitrat $\rightleftharpoons$ cis-Akonitat+H_2O $\rightleftharpoons$ İzositrat	Akonitaz	Fe^{+2}	-1,5
3. İzositrat+$NAD^+ \rightleftharpoons$ α-ketoglutarat+CO_2	İzositrat dehidrogenaz	NAD^+	-2,0
4. α-Ketoglutarat+NAD^++CoA $\rightleftharpoons$ Süksinil CoA+CO_2+NADH	α-Ketoglutarat dehidrogenaz kompleksi	NAD^+, CoA TPP, lipoat FAD	-7,2
5. Süksinil CoA+P_i+GDP $\rightleftharpoons$ Süksinat+CoA+GTP	Süksinil CoA sentetaz	CoA	-0,8
6. Süksinat+FAD $\rightleftharpoons$ Fumarat $+FADH_2$	Süksinat dehidrogenaz	FAD	$\sim$0,0
7. Fumarat+$H_2O \rightleftharpoons$ L-Malat	Fumaraz	-	-0,9
8. L-Malat+$NAD^+ \rightleftharpoons$ Okzal-asetat+NADH+H^+	Malat dehidro-genaz	NAD^+	+7,1

Piruvat dehidrogenaz kompleksinin kontrolü: Piruvattan asetil CoA'nın teşekkülü, metabolizmada kilit mevkide bulunan dönüşümsüz bir reaksiyondur. Çünkü, hayvanlar asetil CoA'yı glukoza dönüştürecek metabolik yoldan mahrumdur. Bu reaksiyon sonunda, glukoz karbon atomlarının önünde iki akibet vardır. Birincisi, beraberinde enerjinin açığa çıktığı TCA devriyle CO_2'ye yükseltgenmesi ve ikincisi de, lipidlere çevrilmesidir. Bundan dolayı piruvat dehidrogenaz kompleksinin aktivitesi çok yönlü olarak düzenlenmelidir. Bu düzenlenme üç seviyede gerçekleştirilir:

1-Ürün inhibisyonu ile: Piruvat oksidasyonunun ürünleri olan NADH ve asetil CoA, enzim kompleksini inhibe eder. Bu etki CoA ve NAD^+ tarafından ortadan kaldırılır.

2-Nükleotidlerin inhibisyonu: Enzim kompleksinin aktivitesi enerji yükü tarafından da kontrol edilir. Enzimin piruvat dehidrogenaz bileşeni GTP ile inhibe edilirken, AMP tarafından tekrar aktive edilir. Yine kompleks aktivitesi, kullanılabilecek enerji yükü olduğu zaman azaltılır.

3. Kovalent modifikasyon ile düzenlenmesi: Kompleksin piruvat dehidrogenaz bileşeni üzerindeki spesifik bir serin rezidüsü ATP tarafından fosforillendiği zaman, kompleks aktivitesini tamamen kaybeder. Fosforilasyon, yüksek ATP/ADP, asetil CoA/CoA ve $NADH/NAD^+$ oranlarında artarken piruvat tarafından inhibe edilir. Enzim kompleksi fosforil grubunun spesifik bir fosfataz enzimi tarafından hidrolizlenmesi sonucu tekrar aktif hale geçer.

Sitrik asit devrinin kontrolü: TCA devrinin hızı hücrenin ATP ihtiyacını karşılayacak şekilde ayarlanır. Okzalasetat ve asetil CoA'dan sitratın sentezi, siklüsteki önemli bir kontrol noktasıdır. ATP, sitrat sentazın allosterik bir inhibitörüdür ve enzimin asetil CoA'ya karşı K_M değerini artırır. Bunun sonucu olarak, ATP seviyesi yükseldikçe daha az enzim asetil CoA ile doyacağından daha az sitrat oluşacaktır.

İkinci kontrol noktası da izositrat dehidrogenazdır. Bu enzim allosterik olarak ADP tarafından uyarılarak substratlarına afinitesi artırılır. İzositratın NAD^+, Mg^{+2} ve ADP'ye bağlanması kooperatif bir olaydır. $NADP^+$ ise NAD^+'nin yerini alarak enzimi inhibe eder.

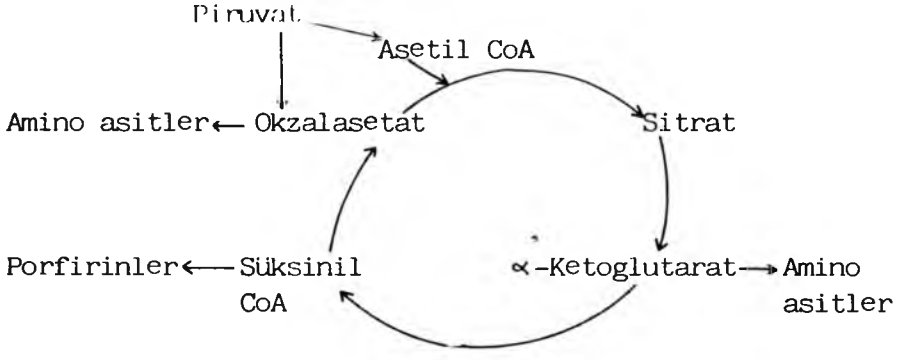
Siklüsün üçüncü kontrol noktası α-ketoglutarat dehidrogenaz enzimidir. Bu enzim kompleksinin kontrolü, piruvat dehidrogenaz kompleksininkine çok benzemektedir. Ürünleri olan NADH ile süksinil CoA ve yüksek enerji yükü tarafından inhibe edilir.

11.3.c. TCA Devri Ara Bileşiklerinin Biyosentetik Önemi

TCA devrini incelemeğe başlarken bu devrin aynı zamanda biyosentez olaylarında kullanılmak üzere birtakım ara bileşikler sağladığını da belirtmiştik. Meselâ porfirinlerdeki karbon atomlarının çoğu süksinil CoA'dan gelmektedir. Amino asitlerin bir çoğu ∝-ketoglutarattan ve okzalasetatdan türetilir (Şekil 11.4). Amino asit metabolizmasında bunu daha ayrıntılı olarak ele alacağız. Burada önemli bir nokta da, sitrik asit devrinin biyosentez olaylarında kullanılan ara bileşiklerinin telafi edilebilmesidir. Meselâ, okzalasetat protein sentezinde kullanılmak üzere amino asitlere çevrildiği zaman, eğer yeniden okzalasetat üretilmezse TCA siklüsü durur. Memelilerde asetil CoA'dan okzalasetat ve diğer TCA devri ara bileşiklerini sentezleyecek enzimler yoktur. Bunun yerine piruvat, piruvat karboksilaz enzimi katalizörlüğü ile okzalasetata çevrilir.

$$\text{Piruvat} + CO_2 + \text{ATP} + H_2O \rightleftharpoons \text{Okzalasetat} + \text{ADP} + P_i + 2H^+$$

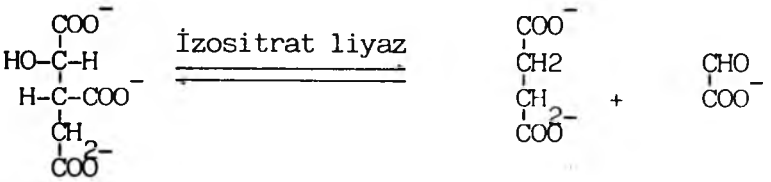
Piruvatın karboksilasyonu, metabolizmada telafi reaksiyonlarından birisidir.



Şekil 11.4. Sitrik asit devrinin biyosentetik rolleri. Biyosentez için harcanan ara bileşikler, piruvattan okzalasetatın teşekkülü ile telafi edilirler.

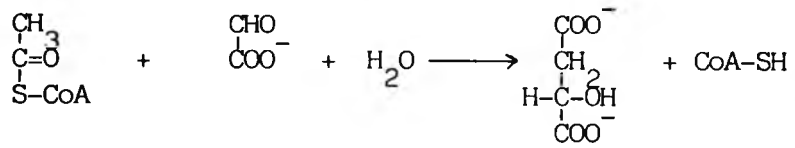
11.4. GLİOKSİLAT DEVRİ

Piruvat dehidrogenaz multienzim kompleksi tarafından katalizlenen piruvatın asetil CoA'ya dönüştürülmesi reaksiyonu dönüşümsüz olduğundan, hayvan organizmalarında asetil CoA'dan karbohidratların sentezi mümkün değildir. İleride yağ asitlerinin metabolizmasında göreceğimiz gibi, yağ asitlerinin oksidasyonunda da asetil CoA birimleri hasıl olur. Bu yüzden hayvanlarda lipidlerden şekerlerin sentez yolu kapalıdır. Fakat yüksek bitkilerde, E.coli gibi mikroorganizmalarda ve alglerde bulunan iki farklı enzim bu organizmalarda lipidlerden şekerlerin ve diğer biyosentetik ara bileşiklerin husulüne fırsat verir. Bu enzimler glioksilat devri adı verilen ve TCA devrinin modifiye şeklini ihtiva eden bir metabolik yolda yer alırlar. Bu devirde önce bir asetil CoA izositrat teşkil etmek üzere okzalasetatla kondanse olur. Bu noktada ilk farklı enzim olan izositrat liyaz katalizörlüğünde bir aldol parçalanmasıyla izositrat, süksinat ve glioksilata ayrılır:



İzositrat Süksinat Glioksilat

Meydana gelen glioksilat, ikinci farklı enzim malat sentaz katalizörlüğünde ikinci bir asetil CoA ile kondanse olarak malat husule gelir:



Asetil CoA Glioksilat Malat Koenzim A

Malat daha sonra bir başka asetil CoA ile kondanse olabilecek okzalasetata oksitlenir. Glioksilatın her devrinde iki asetil CoA girer ve biyosentetik yolda (özellikle glukoneogenezde ön bileşik olarak) kullanılacak bir süksinat ve oksidatif fosforilasyon ile ADP'nin fosforilasyonunu sonuç verecek elektron taşıyıcı bir NADH meydana gelir.

$$2 \text{ Asetil CoA} + NAD^+ + 2H_2O \longrightarrow \text{Süksinat} + 2CoA + NADH + H^+$$

Bu devir hücreye hem enerji hem de dört karbonlu bir biyosentetik ara bileşiği sağlar. Bu devire hayvan organizmalarında rastlanılmamasına rağmen, yüksek bitki tohumlarında çok bulunur. Bu tohumlarda trigliserid depolarındaki yağ asitlerinden türetilen asetil birimleri, süksinat yoluyla karbohidratlara çevrilir.

Yüksek bitkilerde TCA devri reaksiyonları mitokondrilerde vuku bulmasına rağmen, glioksilat devri, özellikle izositrat liyaz ve malat sentez enzimleri, başka sitoplazmik organellerde, yani glioksizomlarda bulunur. Bu membranla sarılı organallerde TCA devrinin birçok enzimleri ve elektron transport sistemi yer almaz.

11.5. OKSİDATİF FOSFORİLASYON

Glikoliz, yağ asitleri oksidasyonu ve sitrik asit siklüsünde teşekkül eden NADH ve $FADH_2$, enerjice zengin moleküllerdir. Çünkü, herbiri yüksek bir transfer potansiyeline sahip bir elektron çifti ihtiva eder. Bu elektronlar O_2'ye aktarıldığı zaman büyük miktarda enerji salınır. Bu enerji de ATP sentezinde kullanılabilir. İşte NADH ve $FADH_2$'den elektronların bir seri elektron taşıyıcıları vasıtasıyla O_2'ye transferi beraberliğinde ATP'nin sentezlendiği olaya oksidatif fosforilasyon adı verilir. Aerobik organizmalarda ATP'nin en önemli kaynağı budur. Meselâ glukozun CO_2 ve H_2O'ya oksidasyonunda elde edilen 36 ATP den 32'si oksidatif fosforilasyonla sağlanır. Bu prosesi ayrıntılı olarak incelemeden önce bazı önemli özelliklerini şöyle özetleyebiliriz:

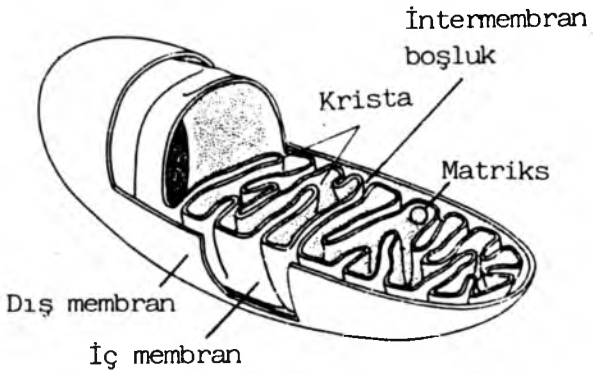
1. Oksidatif fosforilasyon mitokondri iç membranında yer alan bir solunum zinciri tarafından yürütülür. NADH ve $FADH_2$'nin çoğunu sağlayan TCA devri ve yağ asitleri oksidasyonu yolları mitokondri iç zarına bitişik matrikstedir.

2. NADH'ın oksidasyonu 3 ATP, $FADH_2$'nin ki ise, 2 ATP verir. Oksidasyon ve fosforilasyon beraber yürüyen mekanizmalardır.

3. Solunum zinciri sitokromlar gibi, birçok çeşit elektron taşıyıcıları ihtiva eder. NADH veya $FADH_2$'den elektronların O_2'ye bu taşıyıcılar tarafından basamak basamak transferi esnasında mitokondri matriksi dışına protonlar pompalanır ve bir membran potansiyelinin oluşmasına yol açar (proton-motif kuvvet). Protonlar, üç çeşit elektron transfer kompleksi tarafından pompalanır. Bu protonların bir enzim kompleksi içinden mitokondri matriksine geri akışı esnasında da ATP sentezlenir. Yani oksidasyon ve fosforilasyon olayları, iç mitokondri membranı üzerindeki bir proton gradienti ile bağlantılıdır. Solunum zinciri enzimleri iç mitokondri membranının integral proteinleridir. Dış membranın birçok küçük molekül ve iyonlara karşı geçirgen olmasına karşılık, mitokondri iç membranı hemen hemen bütün iyonları ve yüksüz moleküllerin çoğunu geçirmez. ADP ve uzun zincirli yağ asitlerini matrikse taşımak için, iç mitokondri membranında spesifik protein yapısında taşıyıcılar vardır. Şekil 11.5'de bir mitokondri şematik olarak gösterilmiştir.

11.5.a. Redoks Potansiyelleri ve Serbest Enerji Değişimleri

Oksidatif fosforilasyonda NADH ve $FADH_2$'nin elektron-transfer potansiyelleri ATP'nin fosfat transfer potansiyeline dönüştürülmektedir. Bu serbest enerji şekilleri için kantitatif ifadelere ihtiyacımız vardır. Fosfat transferi potansiyelinin ölçüsü olarak önceden ΔG° değerini tarif etmiştik. Elektron-transfer potansiyelinin bu



Şekil 11.5. Bir mitokondrinin şematik gösterilişi.

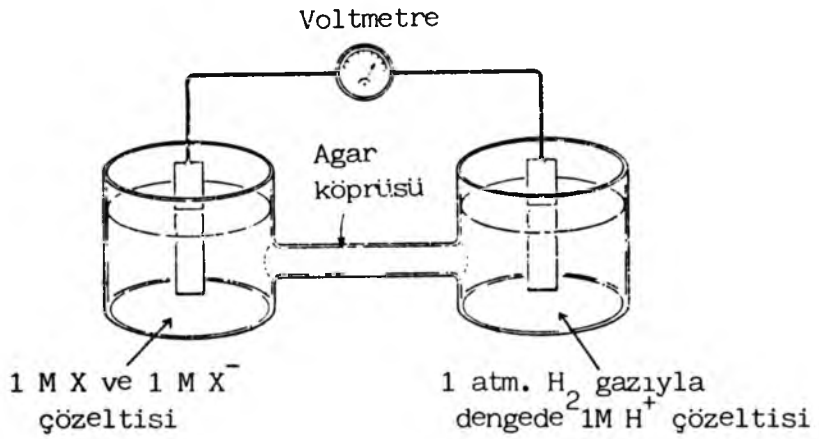
na tekabül eden E_o ile gösterilen redoks potansiyelidir (yükseltgenme-indirgenme potansiyeli olarak da isimlendirilir).

Redoks potansiyeli elektrokimyasal bir kavramdır. Yükseltgenmiş şekli X, indirgenmiş hali de X^- olan bir madde ele alalım. Böyle bir ikili, redoks çifti olarak isimlendirilir. Bu çiftin redoks potansiyeli, bir nümune yarı pilinin, bir standard referans yarı piline göre ortaya çıkan elektromotor kuvvetin ölçülmesiyle tayin edilir. Nümune yarı pili, 1M yükseltgeyici (X) ve 1M indirgeyici (X^-) ihtiva eden çözeltiye bir elektrod batırılmasıyla elde edilirken, standart referans yarı pili de içine bir elektrod sokulmuş 1 atm H_2 gazıyla dengede olan 1M'lık H^+ çözeltisinden ibarettir (Şekil 11.6). Elektrodlar birbirine bir voltmetre ile, yarı piller de elektrik akımını geçirecek bir tuz köprüsüyle bağlanır. Elektronlar bir yarı pilden diğerine akarlar. Eğer reaksiyon

$X^- + H^+ \longrightarrow X + 1/2\ H_2$ yönünde ise, yarı pillerdeki reaksiyonlar şunlardır:

$X^- \longrightarrow X + e^-$ ve $H^+ + e^- \longrightarrow 1/2\ H_2$

Nümune yarı pilinden standart referans yarı pile elektronların akışı sonucu nümune elektrodu diğerine göre negatif olur. $X:X^-$ çiftinin redoks potansiyeli deneyde okunan voltajdır. Çünkü $H^+:H_2$ çiftinin redoks potansiyeli 0 volt olarak tarif edilmiştir.



Şekil 11.6. Bir redoks çiftinin yükseltgenme-indirgenme potansiyelinin ölçülmesi.

Redoks potansiyelinin manası şimdi daha belirginleşmiştir. Negatif bir redoks potansiyeli o maddenin, aynen yukarıdaki örnekte olduğu gibi, elektronlara H_2'den daha az afinitesi, pozitif bir redoks potansiyeli de H_2'den daha yüksek bir elektron afinitesi olduğunu gösterir. Bu mukayeseler standart şartlarda, yani 1 M indirgeyici, 1 M yükseltgeyici, 1 M H^+ ve 1 atm. H_2 durumunda geçerlidir. Nitekim kuvvetli bir indirgeyici (NADH gibi) negatif redoks potansiyeline, kuvvetli bir yükseltgeyici de (O_2 gibi) pozitif redoks potansiyeline sahiptir.

Tablo 11.6'da biyolojik öneme haiz bazı redoks çiftlerinin redoks potansiyelleri verilmiştir. Bir indirgenme-yükseltgenme reaksiyonunun serbest enerji değişimi ($\Delta G°$), reaktantların redoks potansiyellerinden faydalanılarak bulunabilir. Meselâ piruvatın NADH tarafından indirgenme reaksiyonunu ele alalım:

$$\text{Piruvat} + \text{NADH}+\text{H}^+ \rightleftharpoons \text{Laktat}+\text{NAD}^+$$

NAD^+ : NADH çiftinin redoks potansiyeli -0,32 V, piruvat: laktat çiftinin ise, -0,19 V'dur. Yukarıdaki reaksiyon yönüne göre yarı pil reaksiyonlarını yazdığımızda, ikinci reaksiyon ($NADH \longrightarrow NAD^+$) Tablo 1.6'daki E_o değerlerinin

verildiği yönün tersine cereyan ettiğinden redoks potansiyelinin işareti de değişir.

Tablo 11.6. Bazı biyolojik reaksiyonların standart redoks potansiyelleri. E_o, standart redoks potansiyeli (pH= 7 ve 25°C'da),n, transfer edilen elektron sayısı. E_o değerleri yükseltgeyici+e^-→indirgeyici yönündeki reaksiyona aittir.

Yükseltgeyici	İndirgeyici	n	E_o
Asetat	Asetaldehid	2	-0,60
Ferredoksin (yük.)	Ferredoksin (ind.)	1	-0,43
$2H^+$	H_2	2	-0,42
NAD^+	$NADH+H^+$	2	-0,32
$NADP^+$	$NADPH+H^+$	2	-0,32
Lipoat (yük.)	Lipoat(ind.)	2	-0,29
Glutatyon (yük.)	Glutatyon (ind.)	2	-0,23
Asetaldehid	Etanol	2	-0,20
Piruvat	Laktat	2	-0,19
Fumarat	Süksinat	2	0,03
Sitokrom b (+3)	Sitokrom b (+2)	1	0,07
Dehidroaskorbat	Askorbat	2	0,08
Ubikinon (yük.)	Ubikinon(ind.)	2	0,10
Sitokrom c (+3)	Sitokrom c (+2)	1	0,22
Fe (+3)	Fe (+2)	1	0,77
$1/2\ O_2+2H^+$	H_2O	2	0,82

$$\text{Piruvat}+2H^+ + 2e^- \longrightarrow \text{Laktat} \qquad E_o = -0{,}19\ V$$
$$NADH \longrightarrow NAD^+ + H^+ + 2e^- \qquad E_o = +0{,}32\ V$$
$$\Delta E_o = +0{,}13\ V$$

Her iki reaksiyonu ve karşılığındaki redoks potansiyellerini topladığımız zaman, istenilen reaksiyonu ve onun elektromotor kuvvetini elde ederiz. Bunun serbest enerji karşılığı nedir?

$\Delta G°$ ile ΔE_o arasında aşağıdaki bağıntı vardır:

$$\Delta G° = -nF\Delta E_o$$

Burada n, transfer edilen elektron sayısı; F, bir faradayın kalorik eşdeğeri (23,062 kcal V^{-1} mol^{-1})'dir. Piruvatın indirgenmesinde n=2 olduğundan

$\Delta G^{o}=-2x23,062x0,13$

$=-6$ kcal/mol

Pozitif bir E_o değeri standart şartlarda reaksiyonun ekzergonik olduğunu gösterir.

Şimdi aynı hesaplamayı NADH'ın O_2 tarafından yükseltgenmesi reaksiyonu için yapalım. Önce yarı reaksiyonları yazarak toplayalım:

$$1/2\ O_2+2H^+ +2e^- \rightleftharpoons H_2O \qquad E_o=+0,82\ V$$
$$NADH \rightleftharpoons NAD^+ +H^+ +2e^- \qquad E_o=+0,32\ V$$

$$1/2\ O_2+NADH+H^+ \rightleftharpoons H_2O+NAD^+ \qquad \Delta E_o=1,14\ V$$

Bu reaksiyonun serbest enerji değişimi de

$\Delta G^{o}=-nF\Delta E_o = -2x23,062x1,14$

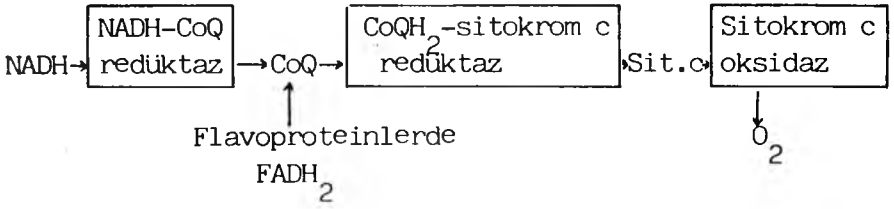
$=-52,6$ kcal/mol olarak bulunur.

11.5.b. Elektron Transport Zinciri (Solunum Zinciri)

Elektronlar NADH'tan O_2'ye flavinlerden, demir-sülfür komplekslerinden, kinonlardan ve hem gruplarından ibaret elektron taşıyıcıları tarafından aktarılır(Şekil 11.7).Kinonların dışında bu elektron taşıyıcıların tamamı proteinlerin prostetik gruplarıdır. İlk reaksiyon NADH'ın NADH-CoQ redüktaz multienzim kompleksi tarafından yükseltgenmesidir. Bu kompleks en az 16 polipeptid zincirinden ibarettir. NADH'dan iki elektron enzimin prostetik grubu olan flavin mononükleotid (FMN)'e aktarılarak $FMNH_2$'ye indirgenir. FMN, FAD'deki reaktif kısım izoalloksazine yalnız ribitol-5-fosfat bağlanmış halidir(Şekil 9.3).

$$NADH+H^+ +FMN \longrightarrow FMNH_2+NAD^+$$

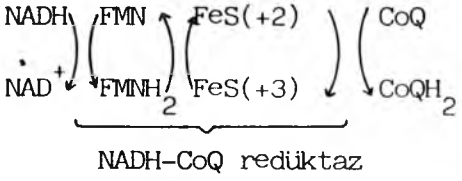
Daha sonra elektronlar $FMNH_2$'den NADH-CoQ redüktaz kompleksinin bir başka prostetik grubunu teşkil eden bir seri demir-sülfür (FeS olarak gösterilir) komplekslerine aktarılır. Burada demir atomları "hem" grubuna ait değildir.



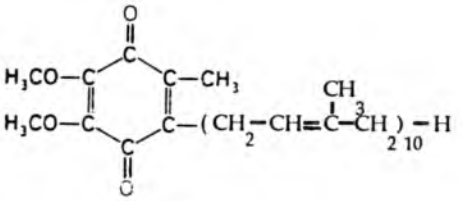
Şekil 11.7. Solunum zincirinde yer alan elektron taşıyıcıları. Protonlar dikdörtgen içine alınmış üç kompleks tarafından pompalanır.

Son yıllarda yapılan araştırmalar demir-sülfür proteinlerinin biyolojik sistemlerdeki birçok redoks reaksiyonlarında çok önemli roller oynadığını ortaya koymuştur. Üç tip FeS merkezi bilinmektedir (Şekil 11.8). Bunların en basitinde, tek bir Fe atomu, protein yapısındaki sisteinlerin -SH gruplarına tetrahedral koordinasyon bağları ile bağlanmış haldedir. Fe_2S_2 ile gösterilen ikinci tipte iki Fe atomu, iki inorganik sülfür ve dört sistein -SH grubu vardır. Üçüncü tip merkez Fe_4S_4 şeklinde gösterilir ve dört Fe atomu dört inorganik sülfür ve dört de sistein -SH grubu ihtiva eder. Bu komplekslerde demir atomu, Fe^{+2} ve Fe^{+3} yükseltgenme basamaklarındadır. NADH-CoQ redüktaz sisteminde hem Fe_2S_2 hem de Fe_4S_4 tipindeki merkezler vardır.

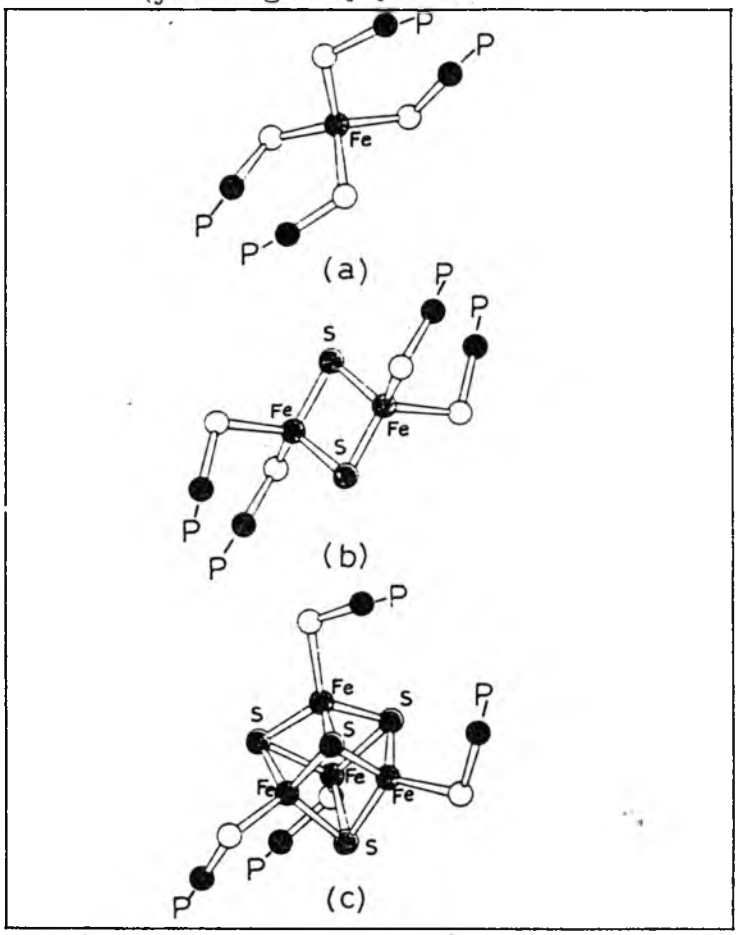
NADH-Q redüktaz enzimindeki demir-sülfür merkezlerinden elektronlar, koenzim Q'ya transfer edilir. Koenzim Q (CoQ) uzun bir izopren zinciri takılı bir kinon türevi olup, ubikinon adı da verilir. İzopren birimlerinin sayısı türden türe değişir. Memelilerde en bol bulunanı 10 izopren birimine sahiptir ve



CoQ_{10} olarak gösterilir:



CoQ_{10}
(yükseltgenmiş şekli)



Şekil 11.8. Demir-Sülfür kompleksleri. a) FeS, b) Fe_2S_2 ve c) Fe_4S_4. P-bağlı sülfürler proteinlerdeki sistein-SH gruplarıdır.

İzopren zinciri CoQ'yu oldukça apolar yapar ve iç mitokondri membranında hidrokarbon fazına kolayca difüze olmasını sağlar. CoQ solunum zincirinde bir proteinin prostetik grubu olmayan tek elektron taşıyıcıdır ve zincirin flavoproteinleri ile sitokromları arasında oldukça hareketli bir taşıyıcılık görevi yapabilmesine yol açar.

Süksinat dehidrogenaz enzimi tarafından sitrik asit devrinde, süksinatın fumarata yükseltgenmesiyle, $FADH_2$'nin oluştuğunu biliyoruz. Bu enzim süksinat-CoQ redüktaz enzim kompleksinin bir bileşeni olup, diğeri bileşeni de bir FeS proteinidir. Bu kompleks de NADH-CoQ redüktaz gibi iç mitokondri membranının integral proteinidir. $FADH_2$'deki yüksek potansiyele sahip elektronlar komplekstekı FeS merkezlerine ve oradan da solunum zincirindeki CoQ'ya aktarılır. Aynı şekilde ileride göreceğimiz glikoliz olayında meydana gelen NADH elektronlarını devralan gliserol fosfat dehidrogenaz ve yağ asitlerinin oksidasyonunda görev alan yağ açil CoA dehidrogenaz enzimleri de, $FADH_2$ prostetik gruplarındaki elektronlarını CoQ'ya aktararak $CoQH_2$'yi oluştururlar.

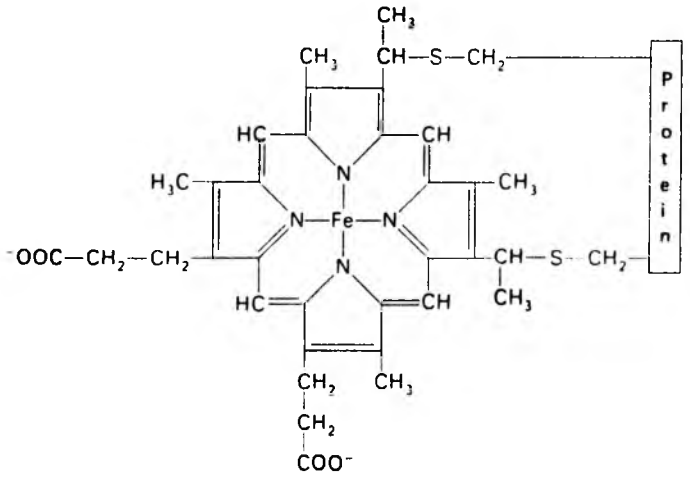
$CoQH_2$ ile O_2 arasındaki elektron taşıyıcılarının bir tane FeS proteinin dışında, hepsi sitokromlardır. Sitokromların solunum olayındaki önemli rolü 1925 yılında David Keilin tarafından keşfedilmiştir. Sitokromlar prostetik grup olarak "hem" grubu ihtiva eden elektron taşıyıcı proteinlerdir. Sitokromlardaki Fe atomları indirgenmiş Fe^{+2} hali ile, yükseltgenmiş Fe^{+3} hali arasında mekik dokur. Hem grubu bir FeS merkezi gibi tek elektron taşıyabilir. Fakat NADH, flavinler ve CoQ iki elektron transfer edebilir. Nitekim bir $CoQH_2$ molekülü yüksek potansiyelli iki elektronunu solunum zincirinin müteakip üyesi olan iki adet sitokrom b'ye aktarır.

$CoQH_2$ ile O_2 arasında beş sitokrom vardır. Sitokrom b ve c_1, bir tane FeS proteini ile beraber $CoQH_2$-sitokrom c redüktaz multienzim kompleksinin bileşenleridir. Sitokrom c, elektronları bu kompleksten, bileşen olarak si-

tokrom a ve a_3 ihtiva eden, sitokrom c oksidaz kompleksine transfer ederler. Bu sitokromların redoks potansiyelleri sırayla yükselir:

$$QH_2 \longrightarrow Sit.b \longrightarrow FeS \longrightarrow Sit.C_1 \longrightarrow Sit.c \longrightarrow Sit.a \longrightarrow Sit.a_3 \longrightarrow O_2$$

Bu sitokromların birbirinden farklı yapı ve özellikleri vardır. Sitokrom b, c_1 ve c de prostetik grup "hem" adı verilen bir demir-protoporfirin IX'dur. Bu, hemoglobin ve miyoglobindeki hem grubuyla aynıdır. Sitokrom b'de hem, proteine kovalent bağlanmamıştır. Sitokrom c ve c_1'de hem, proteine tiyoeter bağlarıyla bağlanmıştır. Bu bağlar protein yapısında bulunan iki sisteinin -SH gruplarının hem'in vinil gruplarına katılmasıyla oluşmuştur(Şekil 11.9).



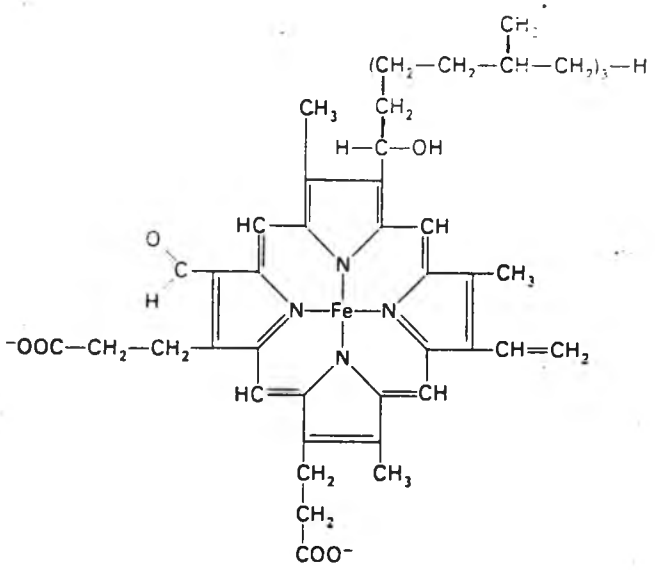
Şekil 11.9. Sitokrom c ve c_1'in yapısı ve tiyoeter bağı teşekkülü.

$$R\text{-}CH{=}CH_2 \;+\; HS\text{-}CH_2\text{-}R' \longrightarrow R\text{-}\underset{\displaystyle CH_3}{CH}\text{-}S\text{-}CH_2\text{-}R'$$

Hem'in vinil grubu	Protein sisteini	Tiyoeter bağı

Sitokrom a ve a_3, hem A adı verilen farklı bir demir-porfirin prostetik grubuna sahiptir(Şekil 11.10).

Hem'den farklı olarak metil gruplarından birinin yerini bir formil grubu, vinil gruplarından birinin yerini de bir hidrokarbon zinciri alır. Sitokrom a va a_3, solunum zincirinin son üyeleridir ve bazen sitokrom oksidaz adı da verilen bir kompleks halinde bulunur.



Şekil 11.10. Hem A'nın yapısı.

$CoQH_2$-sitokrom c redüktaz kompleksi elektronları $CoQH_2$'den, suda çözünebilen bir periferik membran proteini olan sitokrom c'ye transfer eder.

$$CoQH_2 \rightarrow \begin{matrix} Sit.b(+3) \\ Sit.b(+2) \end{matrix} \rightarrow \begin{matrix} FeS(+2) \\ FeS(+3) \end{matrix} \rightarrow \begin{matrix} Sit.c_1(+3) \\ Sit.c_1(+2) \end{matrix} \rightarrow \begin{matrix} Sit.c(+2) \\ Sit.c(+3) \end{matrix}$$

CoQ

$CoQH_2$-sitokrom c redüktaz

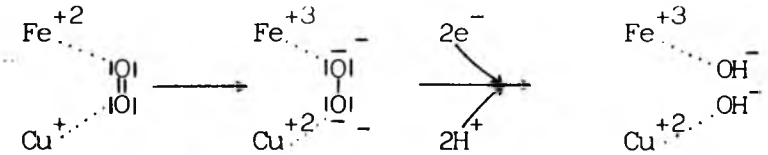
Daha sonra indirgenmiş sitokrom c, elektronunu sitokrom c oksidaz kompleksine aktarır. Sitokrom c'nin rolü CoQ'ya benzemektedir ve solunum zincirindeki kompleksler arasında hareketli bir elektron taşıyıcısı vazifesini görür.

$$\begin{matrix} Sit.c(+2) \\ Sit.c(+3) \end{matrix} \rightarrow \begin{matrix} Sit.a(+3) \\ Sit.a(+2) \end{matrix} \rightarrow \begin{matrix} Sit.a_3(+2) \\ Sit.a_3(+3) \end{matrix} \rightarrow \begin{matrix} Cu(+2) \\ Cu(+1) \end{matrix} \rightarrow \begin{matrix} H_2O \\ O_2 \end{matrix}$$

Elektronlar önce kompleksin sitokrom a bileşenine, oradan da bakır ihtiva eden sitokrom a_3'e aktarılır. Bu bakır atomu sit.a_3'den O_2'ye elektronu transfer ederken +2 ve +1 yükseltgenme basamakları arasında mekik dokur. Bir O_2 molekülünden iki H_2O molekülünün teşekkülü dört elektron gerektiren bir olaydır, fakat hem grupları birer elektron aktarabilmektedir.

$$O_2 + 4H^+ + 4e^- \longrightarrow 2H_2O$$

Dört elektronun bir O_2 molekülünü indirgemek üzere bir araya nasıl geldiği henüz tam aydınlatılmış olmamakla birlikte, çok düşük sıcaklıklardaki spektroskopik araştırmalar reaksiyon mekanizmasının büyük bir ihtimalle aşağıdaki adımlardan geçtiğini göstermiştir:



Sitokrom oksidaz tamamen indirgenmiş durumda iki değerlikli (Fe^{+2}) olarak bulunur, bakır da bir değerliklidir. Oksijen bağlandığında bakırdan ve sitokrom oksidazdan birer elektron aktarılarak peroksit iyonu oluşur. İki elektron ve iki H^+'nın ek transferiyle $2OH^-$ oluşur. Bunlar da tekrar iki H^+ ile birleşerek iki H_2O molekülünü oluştururlar.

Oksijenin eksik indirgenmesinden doğan zararların giderilmesi: Mitokondrial solunum zincirinde elektronların oksijene taşınması sırasında oksijenin kısmi indirgenmiş ürünleri oluşur; bu ürünlerin en önemlileri süperoksit radikali (O_2^-) ve hidrojen peroksittir. Her ikisi de oldukça reaktif olup, birçok biyomoleküllerin dönüşümsüz zarar görmesine yol açarlar. Özellikle membran lipidlerinin doymamış yağ asit komponentlerine saldırarak membran yapısını bozarlar.

I. Fridovich ve arkadaşlarının araştırmaları neticesinde, aerobik hücrelerde bulunan süperoksid dismutaz enziminin süperoksit radikalini hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüştürülebileceği anlaşılmıştır.

$$2O_2^- + 2H^+ \xrightarrow{\text{Süperoksit dismutaz}} H_2O_2 + O_2$$

Süperoksid dismutaz biri sitozolde, diğeri mitokondrilerde olmak üzere iki şekilde bulunur. Ökaryotlardaki mitokondrial süperoksid dismutaz, karakteristik Mn^{+2} muhtevası ve amino asit dizilişi bakımından birçok bakterilerinkine benzer. Buna karşılık sitozoldeki ise, tamamen farklı yapıya sahiptir ve Cu^{+2} ile Zn^{+2} iyonları ihtiva eder. Bu enzimler yüksek konsantrasyonda mevcut olup, fevkalâde aktiftirler.

Süperoksid dismutaz ve flavine bağımlı oksidazlar vasıtasıyla oluşan hidrojen peroksit, hem grubu ihtiva eden bir enzim olan katalaz vasıtasıyla aşağıdaki reaksiyona göre parçalanır:

$$H_2O_2 \xrightarrow{\text{Katalaz}} H_2O + 1/2O_2$$

Katalaz, hayvan hücrelerinin peroksizom organellerinde bulunur.

Süperoksid dismutaz ve katalaz enzimlerinin koruyucu fonksiyonu, muhtemelen askorbik asit, glutatyon ve K vitamini tarafından güçlendirilir; çünkü bu bileşikler kolayca elektron alabilir ve serbest radikalin ortadan kaldırılmasında yakalayıcı fonksiyon üstlenebilirler.

11.5.c. Fosforilasyon ve Kemozmotik Teori

NADH'deki elektronların O_2'ye akışı esnasındaki serbest enerji değişiminin -52,6 kcal/mol olduğunu hesaplamıştık. Bu enerji,

$$ADP + P_i + H^+ \rightleftharpoons ATP + H_2O \qquad \Delta G^\circ = +7,3 \text{ kcal/mol}$$

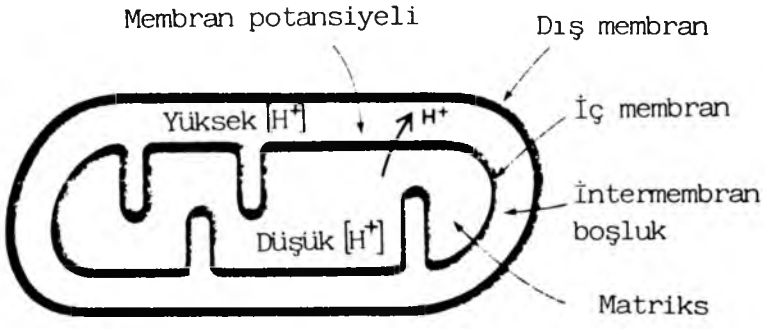
reaksiyonuyla ATP'nin sentezinde kullanılmaktadır. Yukarıdaki reaksiyonu iç mitokondri membranında yer alan ATPaz enzim kompleksi katalizlemektedir.

Şimdi şu sorunun cevabını arayalım: "NADH oksidasyonu ile ADP'nin fosforilasyonu birbirlerine nasıl bağlantılıdır?"

Önceleri, aynen substrat seviyesindeki fosforilasyonda olduğu gibi, yüksek enerjili kovalent bağa sahip ara bileşiğin, ATP sentezinde bir ön bileşik olduğu düşünülmüş, fakat yapılan araştırmalarda sözü edilen yapıda bileşiklere rastlanamamıştır. Başka araştırıcılar da oksidasyon serbest enerjisinin, bir proteinin yüksek enerji gerektiren bir konformasyona dönüşmesiyle tutulup, daha sonra ilk haline dönerken açığa çıkan enerjiden ATP'nin sentezlendiğini ileri sürdüler. Fakat bunlar da deneylerinde bir ipucu elde edemediler.

1961 yılında Peter Mitchell, oldukça farklı bir mekanizma teklif etti. Kemozmotik teori adı verilen fosforilasyon mekanizması, kendisine 1978 Nobel mükâfatını kazandırdı. Mitchell, elektron transportu ve ATP sentezinin yüksek enerjili bir ara bileşiği veya protein konformasyonu değişikliğinden ziyade bir proton gradiyenti ile bağlantılı olduğunu ileri sürdü. Bu modele göre solunum zincirindeki elektron transferi esnasında mitokondri matriksinden protonlar, iç mitokondri zarının sitoplazma tarafına pompalanır. Bunun sonucu olarak bu tarafta H^+ konsantrasyonu artar ve bir membran potansiyeli hasıl olur (Şekil 11.11). Burada ATPaz enzimi tarafından ATP'nin sentezlenmesi olayının proton-motif kuvveti tarafından yürütüldüğü farzedilmektedir. Bu faraziyeye göre mekanizmanın işleyebilmesi için: (1) Solunum zincirindeki elektron taşıyıcılarının ve ATPaz enziminin iç mitokondri membranının iki yüzüne göre dizilmiş olmaları ve (2) İç membranın protonlara karşı geçirgen olmaması lazımdır. İleri sürülen bu mekanizmaya göre NADH'ın oksidasyonu ile açığa çıkan enerji, yüksek bir proton konsantrasyonuna

karşı proton pompalanmasıyla korunmakta ve bu protonların tekrar matrikse dönmeleriyle ATP sentezlenmektedir.



Şekil 11.11. Elektron transportu neticesi, iç mitokondri membranında hasıl olan proton gradienti ve membran potansiyeli.

Mitchell'in bu hipotezi bugün birçok deneysel sonuçlar tarafından desteklenmektedir.

1.Elektron transportu sonucu iç mitokondri membranı üzerinde bir proton gradienti meydana gelmektedir. Bunun neticesinde dışarıdaki pH içeriden 1,4 birim daha düşük(Δ pH) ve dış taraf pozitif olmak üzere 0,14 V'luk bir membran potansiyeli ($\Delta \Psi$) hasıl olur. Toplam elektrokimyasal potansiyel de 0,224 V civarında olur ki, bu da 5,2 kcal/mol proton değerindedir.

2.Solunum zinciri çeşitli inhibitörlerle durdurularak suni yoldan mitokondri ve kloroplastlarda oluşturulan pH gradienti sonucunda ATP sentezlendiği gözlenmiştir.

3.Halobakterilerde bulunan mor-membran proteini ışık altında proton pompalamaktadır. Bu bakteri proteini ve sığır kalp ATPaz'ından sentetik olarak hazırlanan fosfolipid veziküllerinin ATP sentezledikleri bulunmuştur. Burada adı geçen protein, solunum zincirinin görevini yapmaktadır. Elde edilen netice solunum zincirinin faali-

yeti ile ATPaz'ın fonksiyonunun farklı olduğunu ve bunların proton gradienti ile bağlantılı bulunduğunu göstermiştir.

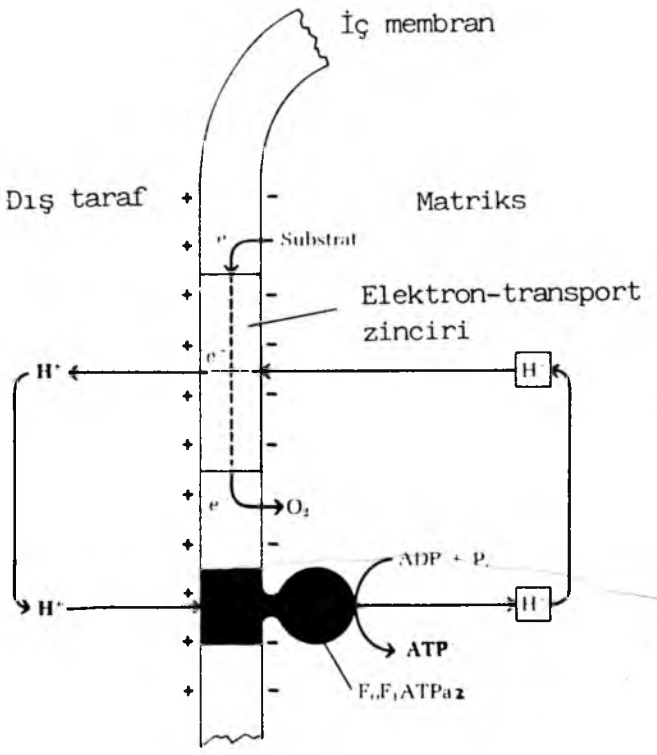
4.İç mitokondri zarı parçaları solunum zinciri ve ATPaz enzimini ihtiva ettikleri ve O_2 kullanabildikleri halde, ATP sentezleyememektedir. Bu da fosforilasyon için kapalı ve sağlam bir bölmenin gerekliliğini ortaya koymuştur.

5.İç mitokondri zarından protonları içeriye taşıyan bileşiklerin fosforilasyonu inhibe ettikleri tesbit edilmiştir.

Solunum zincirindeki bazı proteinlerin aktivitelerini inhibe eden antibiyotik ve inhibitörlerden faydalanılarak zincirin hangi noktalarında proton pompalandığı belirlenmiştir. Bu noktalar üç tanedir ve daha önce bahsettiğimiz solunum zinciri enzim kompleksleridir: NADH-CoQ redüktaz, $CoQH_2$-sitokrom c redüktaz ve sitokrom c oksidaz kompleksleri. Herbir bölgeden pompalanan protonlar bir ATP'nin sentezini gerçekleştirmektidir. $FADH_2$'den gelen elektronlar zincire ikinci kompleksten dahil olduğu için, bir mol $FADH_2$'nin oksidasyonu ile 2 ATP sentezlenir.

ATPaz (adenozin trifosfataz) enzim kompleksi: ATPaz enzim kompleksi F_1 ve F_0 ile gösterilen başlıca iki kısımdan ibarettir. ATP sentezini gerçekleştiren F_1, iç mitokondri membranının matriks yüzünde bulunur ve 5 çeşit polipeptid zincirinden ibarettir. Molekül ağırlığı 360 kdal olan bu kısım elektron mikroskobunda küresel yapılar halinde görülmektedir. F_0 ise, membran içine gömülmüş, dört polipeptid zincirinden ibaret ve hidrofobik yan gruplara sahip amino asitlerden bol miktarda ihtiva etmektedir. Bu kısım, proton geçişi için bir kanal vazifesi görmektedir. F_0 ve F_1 kısımları arasında, aralarında ATP sentezini bloke eden oligomisin antibiyotiğin hassas bir proteinin de bulunduğu birkaç polipeptid zinciri daha

vardır. ATPaz enzim kompleksinin şekli genel olarak bir elma şekerini andırmakta olup, ATP sentezi Şekil 11.12'deki gibi şematize edilebilir.



Şekil 11.12. Kemozmotik teori ve ATP sentezinin şematik gösterilişi.

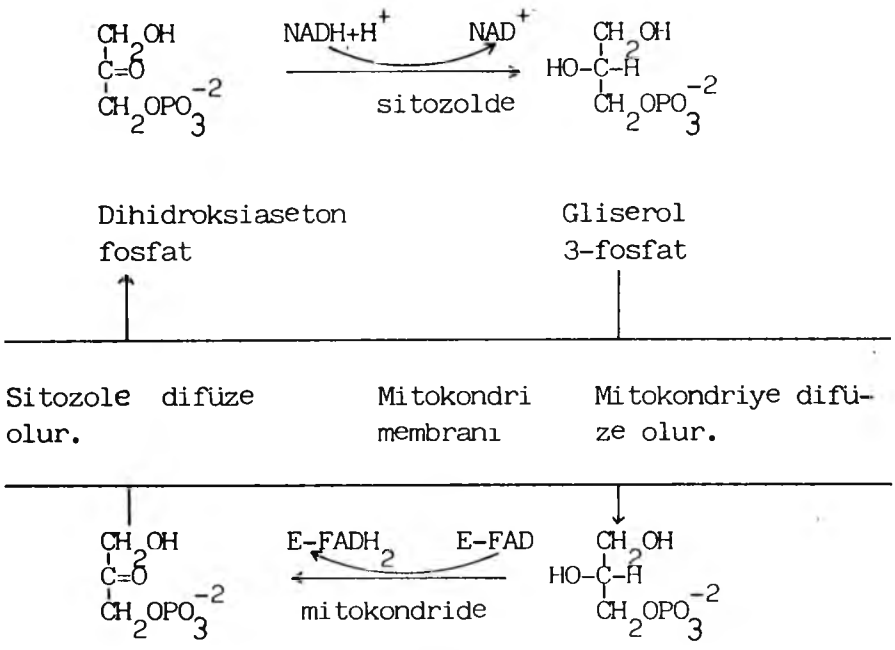
Acaba protonların F_0 kanalından matrikse geçişiyle F_1 tarafından ATP nasıl sentezlenmektedir? Bu konuda proton akışının doğrudan ATP sentezleyen kısmı etkilediği ve bunun sonucu olarak da P_i'nin aktifleşerek aynı anda ADP ile birleştiği ileri sürülmektedir. Ayrıca proton akışının enzim kompleksinde bir konformasyon değişikliğine yol açıp ATP sentezini sağladığı da iddia edilmektedir.

Mitokondriye ADP girişi ve ATP çıkışı: ATP ve ADP iç mitokondri zarından serbestçe difüze olamazlar. Bu çok

yüklü bileşikler özel bir taşıyıcı protein tarafından taşınırlar. Bu taşıyıcının enteresan bir özelliği, matrikse bir ADP molekülünü geçirirken aynı zamanda da bir ATP molekülü dışarı çıkarır. Yani bir takas söz konusudur. Bu olay yaklaşık 58 kdal ağırlığında iki benzer alt birimden ibaret ATP-ADP translokaz enzimi tarafından yürütülür. Bu enzim iç mitokondri zarında bol miktarda bulunur ve toplam proteinlerin yaklaşık % 6'sını teşkil eder. Bu enzimin bazı inhibitörleri oksidatif fosforilasyonu durdurur, çünkü matrikste fosforillenecek ADP kalmaz.

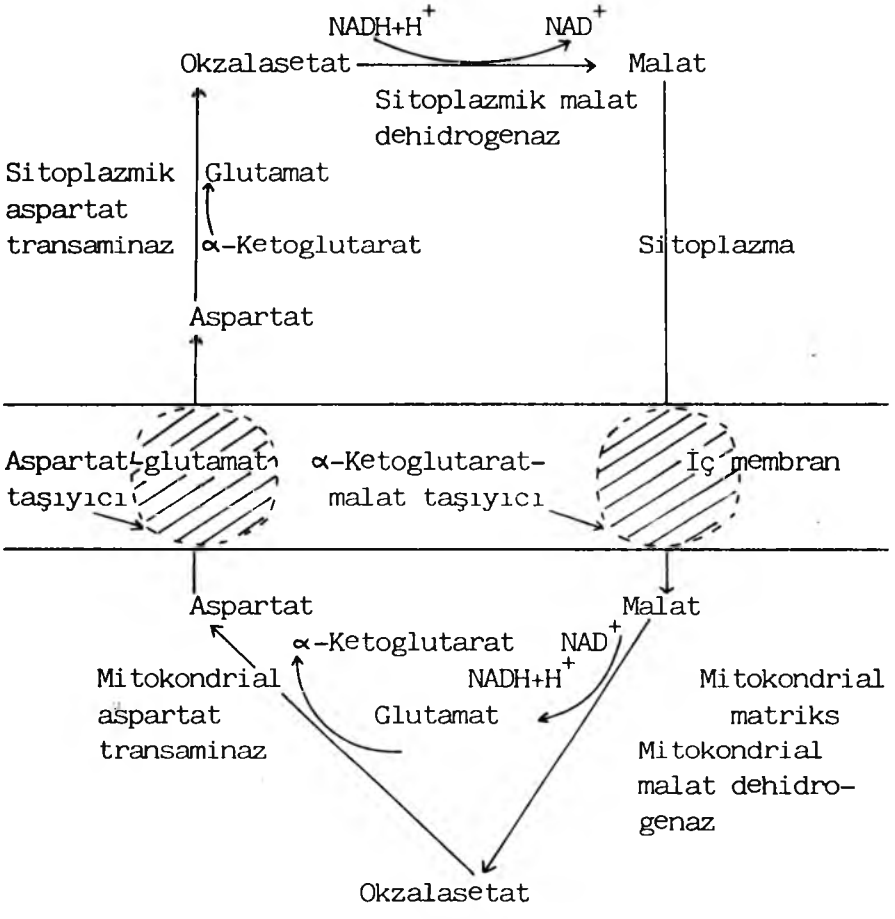
11.5.d. Glikolizde Oluşan NADH'ın Solunum Zincirine Girişi

Sağlam bir mitokondri zarı NADH ve NAD^+'ye karşı geçirgen değildir.Bu durumda glikolizde gliseraldehid 3-fosfatın oksidasyonu sonucu meydana gelen NADH'ın mitokondri içine özel taşıyıcılarla girmesi lazımdır. Bu taşıyıcılardan birisi gliserol 3-fosfattır. Bu molekül kolayca mitokondri içine difüze olabilmektedir. Glikoliz NADH'ındaki elektronların bu yolla mitokondri içine alınması mekanizmasına **gliserol fosfat mekiği** adı verilmektedir. Bu mekikteki ilk basamak, NADH'daki elektronların dihidroksiaseton fosfata aktarılıp, gliserol 3-fosfatın oluşmasıdır. Bu reaksiyon sitozolde vuku bulmakta ve gliserol 3-fosfat dehidrogenaz enzimi tarafından katalizlenmektedir. Daha sonra gliserol 3-fosfat, mitokondriye difüze olur ve burada tekrar dihidroksiaseton fosfata okside olur. Bu oksidasyonu FAD prostetik grubuna sahip olan ve iç mitokondri zarına yapışık bir başka gliserol 3-fosfat dehidrogenaz enzimi katalizler. Bu enzim sitozoldeki NAD^+ bağlı enzimden farklıdır. Dihidroksiaseton fosfat tekrar sitozole geçerek mekiği tamamlar. Mekiği şematik olarak şöyle gösterebiliriz:



Mitokondri içindeki $FADH_2$ de elektronlarını doğrudan CoQ'ya transfer ederek solunum zincirine dahil olur. Gliserol fosfat mekiği vasıtasıyla mitokondriye dahil olan glikoliz NADH'ı elektronları 3 yerine 2 molekül ATP sentezine sebep olur.

Kalp ve karaciğerde sitoplazmik NADH elektronları mitokondriye bir başka mekanizma ile, **malat-aspartat mekiği** vasıtasıyla sokulurlar. Bu mekikte iki taşıyıcı membran proteini ile dört enzim görev alır. Sitoplazmik NADH'dan elektronlar, sitozoldeki okzalasetata aktarılarak malat oluşur. Malat da spesifik taşıyıcı protein tarafından mitokondri içine taşınır ve orada tekrar okzalasetata okside olarak elektronlarıyla yeniden NADH oluşturur. Okzalasetatı taşıyan yeni bir protein olmadığından aminasyon reaksiyonu ile aspartata dönüştürülür ve sitozole çıkar. Orada bir deaminasyon reaksiyonu ile tekrar okzalasetata çevrilir. Malat-aspartat mekiğini kısaca şema ile şöyle özetleyebiliriz:



Gliserol fosfat mekiği tek yönlü işleyen bir mekanizma iken, malat-aspartat mekiği dönüşümlü bir olaydır. Mitokondri içine NADH'ın taşınması $NADH/NAD^+$ oranı yüksek iken gerçekleştirilir. Burada ATP kaybı yoktur ve bir mol glikoliz NADH'ı başına üç mol ATP sentezlenir.

Glukoz oksidasyonunun ATP bilançosu: Şimdi glukozun tamamen CO_2 ve H_2O'ya oksitlenmesi sonucu kaç ATP sentezlendiğini hesaplayabiliriz. Bir glukoz molekülü başına glikoliz, TCA devri ve oksidatif fosforilasyon safhalarındaki ATP verimlerini toplarsak bilançoyu çıkarabiliriz.

Oksidasyon safhası	Glukoz başına ATP verimi
Glikoliz	
Substrat seviyesinde	2
2NADH (malat-aspartat mekiği ile)	6
Piruvatın asetil CoA'ya çevrilmesi	
2NADH	6
TCA devri	
Substrat seviyesinde	2
6NADH	18
$2FADH_2$	4
Toplam	38

Görüldüğü gibi sitoplazmik NADH'ın malat-aspartat mekiği ile mitokondriye girişinde bir molekül glukoz oksidasyonu ile 38 ATP sentezlenmektedir. Eğer gliserol fosfat mekiği kullanılırsa 36 ATP oluşur. Bu esnada 12 oksijen atomu kullanıldığından P:O oranı 36/12=3 olur.

Canlı organizmalarda glukoz oksidasyonu sonucu ATP sentezi, verimi yüksek bir mekanizmadır.

$$\text{Glukoz} + 6O_2 \longrightarrow 6CO_2 + 6H_2O$$

reaksiyonunun standart serbest enerji değişimi -686 kcal/mol olduğuna ve 36 ATP, herbiri -7,3 kcal/mol'den toplam 263 kcal/mol'lük bir serbest enerjiyi yapılarında bulundurduğuna göre, ATP üretimi verimi 263/686 veya % 38 olarak bulunur. Bu, insanoğlunun enerji kaynağı yakıt olan makineleri ile erişemediği bir verimdir.

11.5.e. Oksigenazlar Vasıtasıyla Oksijen Kullanımı

Aerobik yaşayan hücrelerin kullandığı moleküler oksijenin en büyük kısmı, mitokondrial elektronlar tarafından suya indirgenir. Geri kalan az bir kısım ise, oksijen

molekülünün ya bir atomu veya her iki atomunun hidroksil grubu oluşturmasıyla direkt olarak organik substrat moleküllerinin yapısına girmektedir. Bu tip reaksiyonları katalizleyen enzimler, oksigenazlar olarak adlandırılır. Bunlarda kendi içinde iki sınıfa ayrılırlar: Oksijen molekülünün her iki atomunu organik substrat molekülüne sokan dioksigenazlar ve sadece bir atomunu sokan monooksigenazlar.

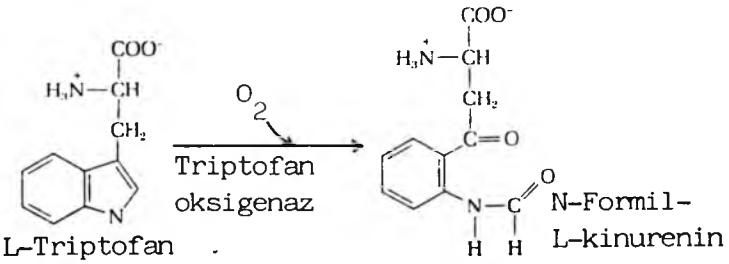
Dioksigenazlar: Oksijen transferazlar olarak da adlandırılan dioksigenazlar aşağıdaki tipten reaksiyonları katalizlerler:

$$AH_2 + O_2 \longrightarrow A(OH)_2$$

Bu reaksiyona göre substrat molekülü dihidroksi formuna dönüşmektedir. Genelde bu tarzda oluşan her iki hidroksil grubu birbirine komşu olur. Bundan dolayı da $A(OH)_2$ ürünü dayanıksızdır ve her iki hidroksil grubu arasındaki C-C bağı kendiliğinden parçalanır.

Dioksigenazların tam bir serisi yüksek saflıkta izole edilebilmiştir. Hepsi ya dayanıksız demir-kükürt bağı halinde veya hem grubu şeklinde demir ihtiva etmektedir; hatta bazıları bakır ihtiva ederler. Bu enzimlere örnek olarak sistematik adı triptofan 2,3-dioksigenaz olan triptofan pirrolaz verilebilir. Bu enzim triptofanın oksidatif yıkımında bir basamağı katalizler. Bu reaksiyonda triptofanın beş üyeli halkasına iki oksijen atomu girer ve iki komşu hidroksil gruplu dayanıksız bir ürün oluşur; buda kendiliğinden aromatik halkanın parçalanmasıyla L-formil kinurenine dönüşür (Şekil 11.13).

Monooksigenazlar: Hidroksilazlar olarak da adlandırılan monooksigenazlar, moleküler oksijenin bir atomunun organik substrata girişini katalizlerler. Diğer oksijen atomu suya indirgenir; bunun için elektron verici olarak ikinci bir substrata ihtiyaç vardır. Bu esasdan dolayı monooksigenazlar karma fonksiyonlu oksigenazlar diye de adlandırılırlar. Bu enzimlerin katalizledikleri genel reaksiyon denklemi şöyle verilebilir:



Şekil 11.13. Triptofan 2,3-dioksigenaz enziminin kataliz-lediği reaksiyon.

$$AH+XH_2+O_2 \longrightarrow AOH+H_2O+X$$

Burada AH hidroksillenmesi istenen substrat, XH_2 elektron verici, AOH hidroksillenmiş substrat ve X yükseltgenmiş elektron vericisini göstermektedir.

Çoğu monooksigenazlı reaksiyonlarda, ikinci oksijen atomunun suya indirgenmesini sağlayan elektronları veren ikinci substrat NADH veya NADPH'dır. Bununla birlikte elektronları NADH veya NADPH'dan oksijene transfer etmek üzere değişik elektron taşıyıcılar gereklidir.

En basit monooksigenazlar FAD ihtiva eden flavoproteinler olup, aşağıdaki birbirini takip eden reaksiyonları katalizlerler:

$$NAD(P)H+E\text{-}FAD \longrightarrow NAD(P)^+ + E\text{-}FADH_2$$

$$E\text{-}FADH_2+AH+O_2 \longrightarrow E\text{-}FAD+AOH+H_2O$$

Bu enzimlere örnek olarak fenilalaninin tirozine dönüşmesini sağlayan fenilalanin 4-monooksigenaz, prokollagendeki prolin ve lisin kalıntılarının hidroksilasyonu reaksiyonlarını katalizleyerek kollagen oluşumunu sağlayan prolin monooksigenaz ve lisin monooksigenaz verilebilir.

11.6. PENTOZ FOSFAT YOLU

Bundan önceki glikoliz, sitrik asit devri ve oksidatif fosforilasyonda başlıca hedef, glukozdan ATP'nin sentezlenmesiydi. Şimdi yeni tipte bir metabolik enerjinin, yani indirgeyici gücün üretilmesiyle ilgileneceğiz. Yakıt moleküllerindeki hidrojen atomları ve elektronların bazılarının biyosentezde kullanılmak üzere korunmaları gerekmektedir. Hücrelerde indirgeyici gücün hemen kullanılabilir şekli NADPH'dır.

Pentoz fosfat yolunda glukoz 6-fosfat, riboz 5-fosfata oksitlenirken NADPH üretilir. Bu beş karbonlu şeker ve onun türevleri, ATP, CoA, NAD^+, FAD, RNA ve DNA gibi hayati öneme haiz biyomoleküllerin bileşenleridir. Bu olayın toplam reaksiyonu

$$\text{Glukoz 6-fosfat} + 2NADP^+ + H_2O \rightarrow \text{Riboz 5-fosfat} + 2NADPH + 2H^+ + CO_2$$

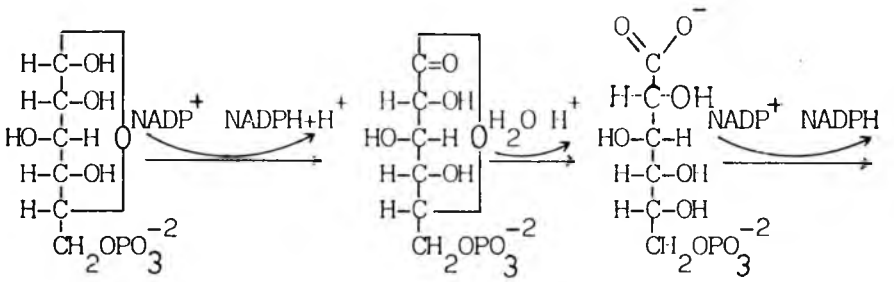
şeklindedir. Pentoz fosfat yolu aynı zamanda üç, dört, beş, altı ve yedi karbonlu şekerlerin oksidatif olmayan bir seri reaksiyonlarla birbirlerine dönüştürülmesini de katalizler. Bu reaksiyonların tamamı sitozolde cereyan eder. Bitkilerde pentoz fosfat yolunun bir bölümü, fotosentez olayı ile CO_2'den glukozun sentezlenmesinde de rol alır.

Pentoz fosfat yolu bazen pentoz yan yolu, heksoz monofosfat yolu veya fosfoglukonat oksidatif yolu olarak da isimlendirilir. Bu reaksiyon serisinin aydınlatılmasında ilk adım, 1931 yılında Otto Warburg tarafından atılmış ve tamamı Fritz Lipmann, Frank Dickens, Bernard Horecker ve Efraim Racker isimli biyokimyacılar tarafından ortaya koyulmuştur.

11.6.a. Pentoz Fosfat Yolu Reaksiyonları

Pentoz fosfat yolu, glukoz 6-fosfatın 1 no'lu karbonunun dehidrogenasyonuyla başlar. Bu reaksiyon glukoz

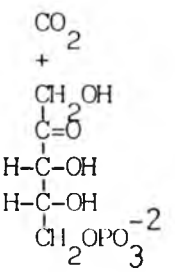
6-fosfat dehidrogenaz enzimi tarafından katalizlenir. Bu enzim $NADP^+$'ye karşı son derece spesifiktir ve NAD^+ için K_M değeri $NADP^+$ için olandan yaklaşık 1000 misli fazladır. Bu reaksiyonun ürünü C-1 karboksili ile C-5 hidroksil grubu arasında teşekkül eden bir molekül içi estere sahip olan 6-fosfoglukuno-δ-laktondur. Bundan sonraki basamak 6-fosfoglukono-δ-laktonun laktonaz enzimi katalizörlüğünde 6-fosfoglukonata hidrolizidir. Bu altı karbonlu şeker daha sonra oksidatif dekarboksilasyonla ribuloz 5-fosfata dönüşür. Bu reaksiyonda koenzimi yine $NADP^+$ olan 6-fosfoglukonat dehidrogenaz enzimi görev alır. Şimdi bu reaksiyonları açık formülleriyle görelim:



Glukoz 6-fosfat

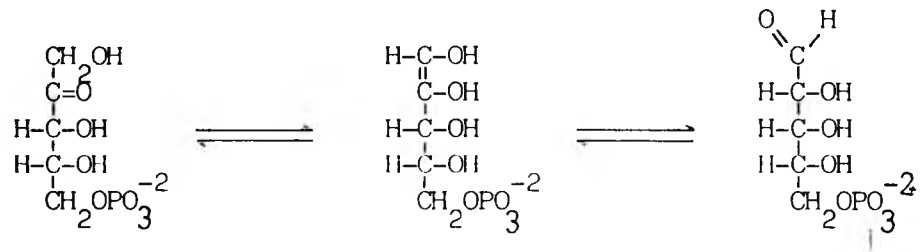
6-Fosfoglukuno-δ-lakton

6-Fosfoglukonat



Ribuloz 5-fosfat

Riboz 5-fosfat sentezinde son basamak ribuloz 5-fosfatın izomerleşme reaksiyonudur:



Ribuloz-5-fosfat Enediyol ara bileşiği Riboz 5-fosfat

"Glukoz 6-fosfat ⇌ fruktoz 6-fosfat" ve "dihidroksiaseton fosfat ⇌ gliseraldehid 3-fosfat" reaksiyonlarına benzeyen bu reaksiyon fosfopentoz izomeraz enzimi tarafından katalizlenir. Bu üç ketoz aldoz izomerleşmesi de bir enediyol ara bileşiği vasıtasıyla gerçekleşir.

Pentoz fosfat yolu ile glikolizin bağlantısı: Yukarıda verdiğimiz reaksiyonlar sonucu bir glukoz molekülü başına iki NADPH ve bir riboz 5-fosfat meydana gelmektedir. Bununla beraber birçok hücreler NADPH'a riboz 5-fosfattan daha çok ihtiyaç duyarlar. Bu durumda riboz 5-fosfat, gliseraldehid 3-fosfat ve fruktoz 6-fosfata çevrilir. Bu reaksiyonlarda transketolaz ve transaldolaz enzimleri rol alır. Bu enzimler, pentoz fosfat yolu ile glikoliz arasında, aşağıdaki üç reaksiyonu katalizleyerek dönüşümlü bir bağlantı teşkil ederler:

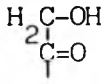
$$C_5 + C_5 \xrightleftharpoons{\text{Transketolaz}} C_3 + C_7$$

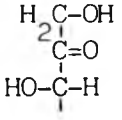
$$C_7 + C_3 \xrightleftharpoons{\text{Transaldolaz}} C_4 + C_6$$

$$C_5 + C_4 \xrightleftharpoons{\text{Transketolaz}} C_3 + C_6$$

Bu reaksiyonların toplamında üç pentozdan iki heksoz ve bir trioz meydana gelir.

Bu reaksiyonlarda transketolaz iki karbonlu, transaldolaz da üç karbonlu birimlerin transferini gerçekleştirir.



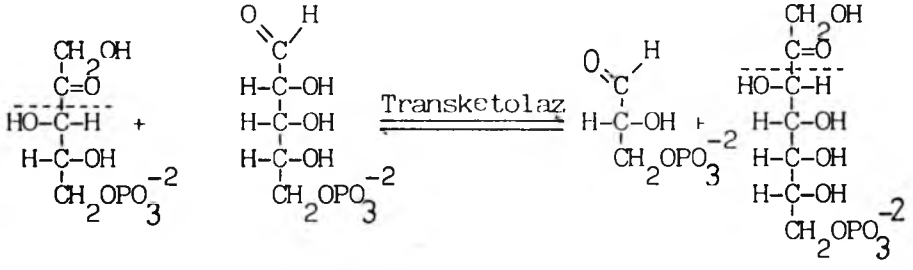


Transketolaz tarafından transfer edilir.

Transaldolaz tarafından transfer edilir.

Yukarıdaki iki ve üç karbonları veren her zaman bir ketoz, alan da bir aldoz şekeridir.

Pentoz fosfat yoluyla glikolizi birbirine bağlayan reaksiyonların ilkinde, iki pentozdan gliseraldehid 3-fosfat ve sedoheptuloz 7-fosfat meydana gelir.



Ksiluloz 5-fosfat

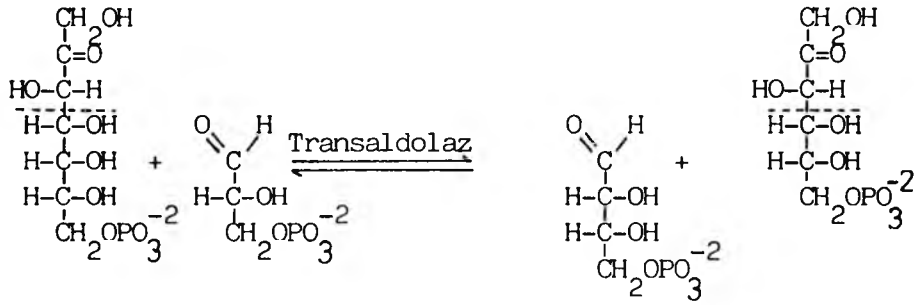
Riboz 5-fosfat

Gliseraldehid 3-fosfat

Sedoheptuloz 7-fosfat

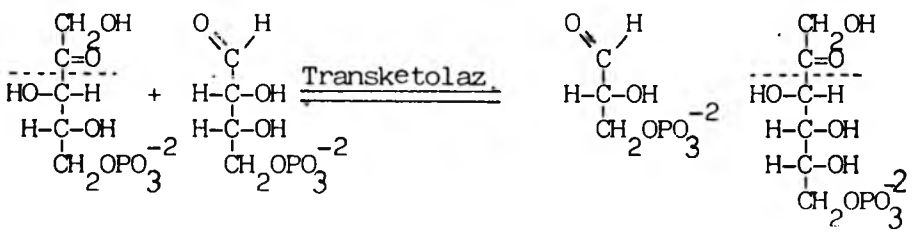
Burada iki karbon birimini veren ksiluloz 5-fosfat, 3 no'lu C'da ribuloz 5-fosfatın epimeri olup, birbirlerine fosfopentozepimeraz vasıtasıyla dönüştürülürler.

Gliseraldehid 3-fosfat ve sedoheptuloz 7-fosfat daha sonra reaksiyona girerek bir fruktoz 6-fosfat ve bir de eritroz 4-fosfat teşkil ederler:



Sedoheptuloz 7-fosfat	Gliseraldehid 3-fosfat	Eritroz 4-fosfat	Fruktoz 6-fosfat

Yukarıdaki reaksiyonda teşekkül eden eritroz 4-fosfat, transketolaz enzimi katalizörlüğünde, ksiluloz- 5-fosfattan iki karbon birimi alarak gliseraldehid 3-fosfat ve fruktoz 6-fosfatı meydana getirir.



Ksiluloz 5-fosfat	Eritroz 4-fosfat	Gliseraldehid 3-fosfat	Fruktoz 6-fosfat

Bu reaksiyonların toplamında

2 Ksiluloz 5-fosfat+ Riboz 5-fosfat $\rightleftharpoons$ 2 Fruktoz 6-fosfat
+Gliseraldehid 3-fosfat

çıkar. Buradaki ksiluloz 5-fosfatın, fosfopentozizomeraz ve epimeraz enzimlerinin sırasıyla görev yapmaları sonucu, riboz 5-fosfattan yapıldığını göz önüne aldığımız zaman, yukarıdaki denklem,

3 Riboz 5-fosfat $\rightleftharpoons$ 2Fruktoz 6-fosfat+Gliseraldehid 3-fosfat

şekline döner. Böylece pentoz fosfat yoluyla meydana gelen fazla riboz 5-fosfat glikoliz ara ürünlerine dönüştürülmüş oluyor.

Pentoz fosfat yolu hızının kontrolü: Pentoz fosfat yolunun ilk reaksiyonu olan glukoz 6-fosfatın dehidrogenasyonu dönüşümsüz bir olaydır. Gerçekten bu basamak fizyolojik şartlarda bu yolun kontrol noktasıdır. $NADP^+$ de en önemli düzenleyici faktördür. NADPH, $NADP^+$ ile ve ATP de glukoz 6-fosfatla enzime bağlanmak için yarış halindedirler. Pentoz fosfat yolunun oksidatif reaksiyonları üzerindeki $NADP^+$ seviyesinin etkisi, indirgeyici biyosentez olaylarında kullanılan NADPH'ın üretimini böylece düzenlemiş olur. Bu yolun oksidatif olmayan reaksiyonları olarak da isimlendirilen, fosfopentozizomeraz, fosfopentozepimeraz, transketolaz ve transaldolaz enzimlerinin katalizledikleri reaksiyonların düzenlenme mekanizması henüz aydınlatılmamıştır.

11.6.b. Hücre İçinde Glukoz 6-fosfat Akibetinin Kontrolü

Glukoz 6-fosfatın hücre içindeki kullanımı, NADPH, riboz 5-fosfat ve ATP ihtiyacına göre yönlendirilir. Bu yönlendirmeyi dört fizyolojik şart altında inceleyelim:

1. Riboz 5-fosfata NADPH'dan daha fazla ihtiyaç duyulduğu durum: Glukoz 6-fosfatın çoğu glikolizle fruktoz 6-fosfat ve gliseraldehid 3-fosfata çevrilir. Daha sonra transketolaz ve transaldolaz enzimleri, daha önceden gördüğümüz reaksiyonların dönüşümlü işlemesi sonucu bir molekül gliseraldehid 3-fosfat ve iki molekül fruktoz 6-

fosfatı üç molekül riboz 5-fosfata dönüştürür (Şekil 11.14.a). Bu yolun stokiyometrik denklemi şöyledir:

$$5\ \text{Glukoz 6-fosfat} + 5\text{ATP} \longrightarrow 6\ \text{Riboz 5-fosfat} + 5\text{ADP} + 5\text{H}^+$$

2. NADPH ve riboz 5-fosfat ihtiyacının eşit olduğu durum: Bu şartlarda pentoz fosfat yolunun oksidatif reaksiyonları işler (Şekil 11.14.b). Bu reaksiyonun stokiyometrik denklemi şöyledir:

$$\text{Glukoz 6-fosfat} + 2\text{NADP}^+ + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Riboz 5-fosfat} + 2\text{NADPH} + 2\text{H}^+ + \text{CO}_2$$

3. NADPH'a riboz 5-fosfattan daha fazla ihtiyaç duyulduğu durum: Bu durumda glukoz 6-fosfat tamamen CO_2'ye yükseltgenir ve bu da üç grup reaksiyonla gerçekleştirilir. Birincisinde iki NADPH ve bir riboz 5-fosfat oksidatif olarak sentezlenir. Daha sonra riboz 5-fosfat, transketolaz ve transaldolazla fruktoz 6-fosfat ve gliseraldehid 3-fosfata dönüştürülür. Son olarak da ileride göreceğimiz glukoneogenez reaksiyonlarıyla gliseraldehid 3-fosfat ve fruktoz 6-fosfattan glukoz 6-fosfat tekrar sentezlenir(Şekil 11.14.c). Bu üç reaksiyon ve bunların toplam stokiyometrik denklemleri şöyledir:

$$6\ \text{Glukoz 6-fosfat} + 12\text{NADP}^+ + 6\text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{Riboz 5-fosfat} + 12\text{NADPH} + 12\text{H}^+ + 6\text{CO}_2$$

$$6\ \text{Riboz 5-fosfat} \longrightarrow 4\ \text{Fruktoz 6-fosfat} + 2\ \text{Gliseraldehid 3-fosfat}$$

$$4\ \text{Fruktoz 6-fosfat} + 2\ \text{Gliseraldehid 3-fosfat} + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow 5\text{-Glukoz 6-fosfat} + \text{P}_i$$

$$+$$

$$\text{Glukoz 6-fosfat} + 12\text{NADP}^+ + 7\text{H}_2\text{O} \longrightarrow 6\text{CO}_2 + 12\text{NADPH} + 12\text{H}^+ + \text{P}_i$$

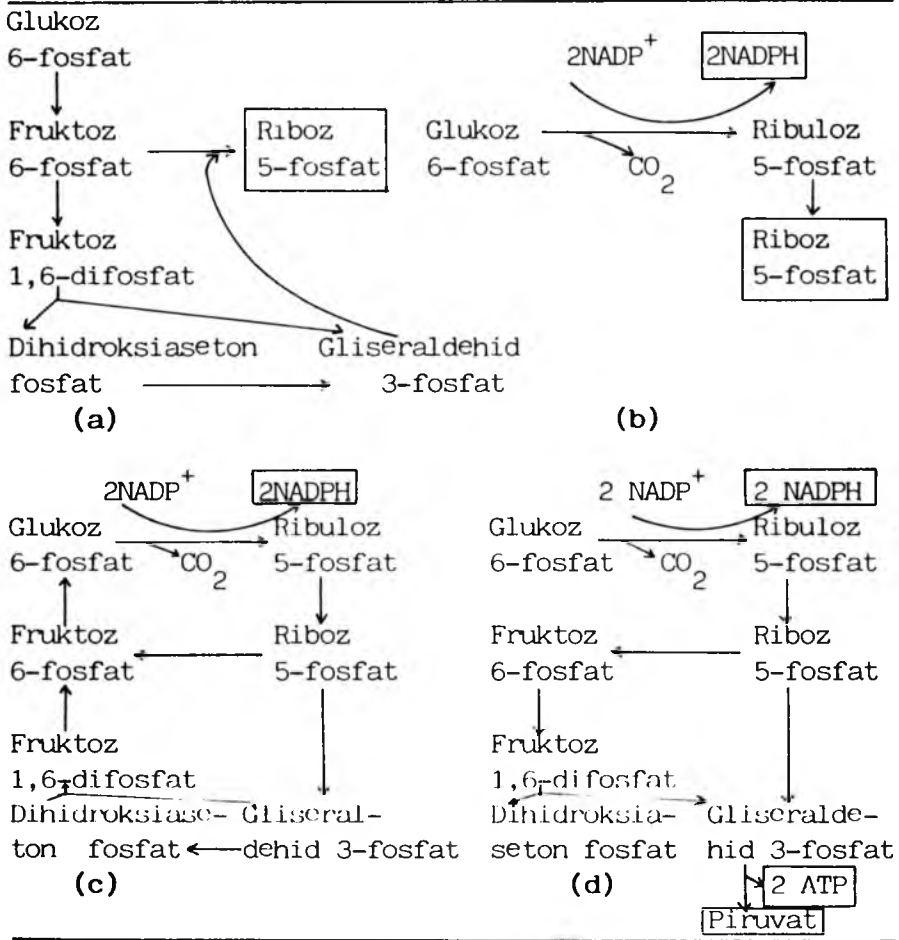
Böylece bir glukoz 6-fosfat tamamen CO_2'ye okside olarak 12 NADPH üretilmiş oluyor.

4. Riboz 5-fosfattan daha çok NADPH'a ve bununla beraber ATP'ye de ihtiyaç duyulduğu durum: Bu durumda

glukoz 6-fosfat piruvata dönüştürülür. Riboz 5-fosfattan türetilen fruktoz 6-fosfat ve gliseraldehid 3-fosfat glukoneogenez yerine glikoliz yoluyla piruvata kadar yükseltgenir. Bu arada NADPH ve ATP beraberce sentezlenmiş olur (Şekil 11.14.d). Stokiyometrik net denklem şöyledir:

$$3\ \text{Glukoz 6-fosfat} + 6NADP^+ + 5NAD^+ + 5\ P_i + 8ADP \longrightarrow 5\ \text{Piruvat} + 3CO_2 + 6NADPH + 5NADH + 8ATP + 2H_2O + 8H^+$$

Bu reaksiyonlarda oluşan piruvat daha fazla sayıda ATP sentezleyecek şekilde oksitlenir veya birçok biyosentez olaylarında yapı taşı olarak kullanılır.

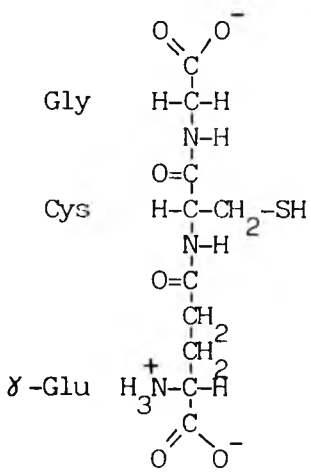


Şekil.11.14. Glukoz-6-fosfatın dört farklı fizyolojik şarta göre metabolize edilmesi. Ana ürünler kutu içinde gösterilmiştir.

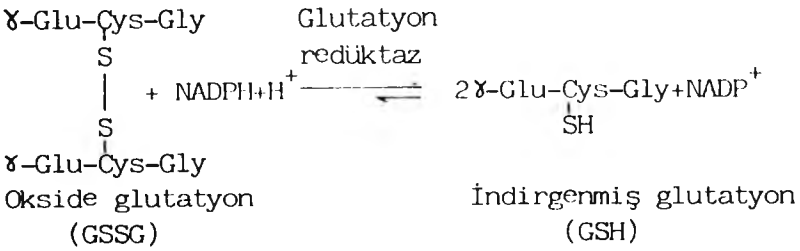
11.6.c. Pentoz Fosfat Yolunun Yağ Dokusu ve Eritrositlerdeki Önemi

Pentoz fosfat yolu ile ilgili radyoaktif ^{14}C ile işaretlenmiş glukoz ile yapılan denemeler, bu yolun kas dokularından ziyade adipoz dokuda (yağ dokusunda) aktif olduğunu göstermiştir. Bu sonuç pentoz fosfat yolunun başlıca rolünün, indirgeyici biyosentez olaylarında kullanılmak üzere, NADPH üretmek olduğu iddiasını desteklemektedir. Çünkü, yağ dokusu hücrelerinde asetil CoA'dan yağ asitlerinin biyosentezinde büyük miktarda NADPH kullanılmaktadır.

Pentoz fosfat yolunun eritrositlerde çok hayati bir rolü vardır. Çünkü üretilen NADPH, okside glutatyonun indirgenmesinde kullanılır. Glutatyon serbest sülfhidril grubuna sahip bir tripeptiddir (ɣ-glutamilsisteinilglisin).



İndirgenmiş glutatyon
(ɣ-Glu-Cys-Gly)
SH



Alyuvarlarda glutatyonun indirgenmiş şekli (GSH), hemoglobin ve diğer eritrosit proteinlerinde bulunan sistein rezidülerini indirgenmiş halde tutarak sülfhidril tamponu vazifesini görür. Kırmızı kan hücrelerinde GSH/GSSG oranı yaklaşık 500'dür. İndirgenmiş glutatyon, hidrojen peroksit ve organik peroksitlerle reaksiyona girerek zehirsizleştirme (detoksifikasyon) olaylarında da rol alır. Bu rolü özellikle karaciğerde çok önemlidir.

$$2GSH+R-O-OH \longrightarrow GSSG+H_2O+ROH$$

Normal eritrosit hücre yapısının devamı ve hemoglobinin Fe^{+2} halinde korunması için GSH zaruridir. Düşük seviyede GSH ihtiva eden alyuvarların daha çok hemolize maruz kaldıkları tesbit edilmesine rağmen sebepleri henüz ortaya koyulamamıştır.

1926 yılında sıtma tedavisinde kullanılmaya başlanan pamakuin, bazı hastalarda birkaç gün sonra ciddi belirtiler ortaya çıkarmıştır. İdrar siyaha dönmüş, sarılıkla beraber kan hemoglobin seviyesi aniden düşmüştü. Bazı vakalar alyuvarların büyük ölçüde tahribatından dolayı ölümle sonuçlanmıştı.

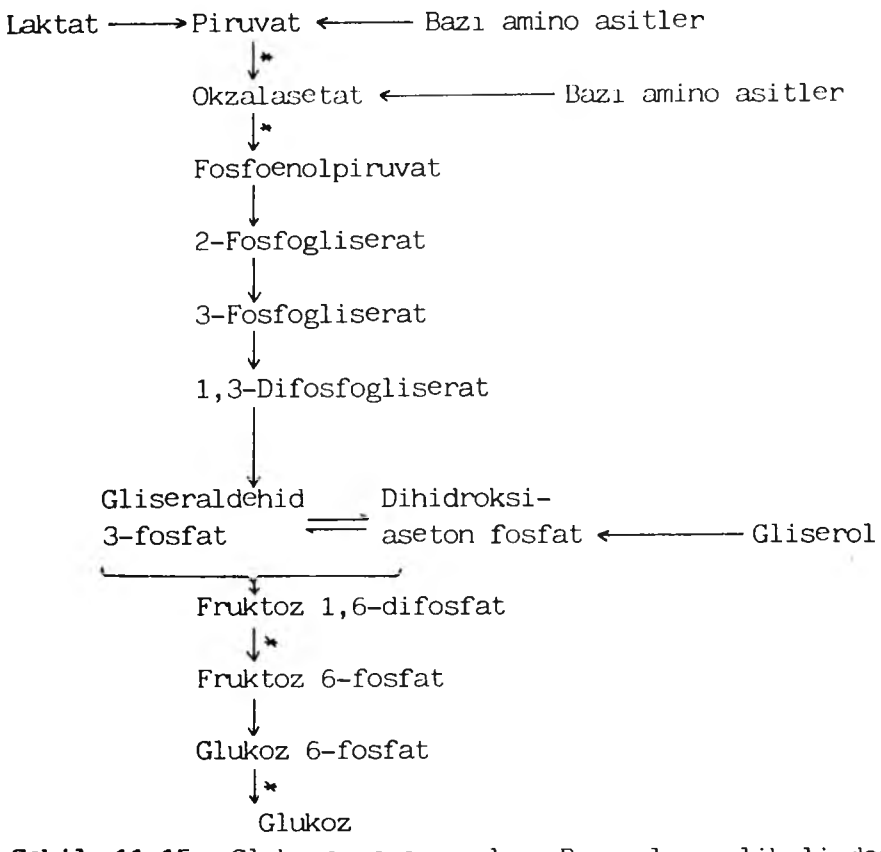
Bu ilaçla ortaya çıkan hemolitik anemi (kansızlık) 1956 da aydınlatılmış ve bu hastalarda alyuvarların glukoz 6-fosfat dehidrogenaz enzimi yetersizliği tesbit edilmiştir. Bu enzim yetersizliğinde NADPH azalması sonucu GSSG'nin indirgenememesinden eritrositlerin hemolizi artmıştır. Bu hastalık genetik bir hastalık olup, tek bir enzimin aktivitesindeki azalmanın ne kadar önemli sonuçlar verdiğini göstermektedir.

11.7. GLUKONEOGENEZ

Glukoneogenez, karbohidrat yapısında olmayan ön maddelerden glukozun sentezlenmesi olayıdır. Bu metabolik yol yakıt olarak en çok glukoz kullanan beyin gibi bazı dokular için çok önemlidir. Ergin bir kişide beyin, günlük olarak 120 gram glukoza ihtiyaç duyar. Bu günlük 160 gram olan ihtiyacın önemli bir bölümünü teşkil etmektedir. Vücut sıvılarındaki glukoz miktarının 20 gram ve glikojenden kolayca sağlanabilecek glukoz da 190 gram civarındadır. Bu glukoz revervleri vücudun bir günlük ihtiyacı için yeterlidir. Daha uzun bir açlık döneminde glukozun karbohidrat olmayan kaynaklardan sentezlenmesi gerekmektedir. Glukoneogenez yoğun eksersiz süresinde de önemlidir.

Glukoneogenezin önde gelen çıkış maddeleri laktat, amino asitler ve gliseroldur. Laktat, glikoliz hızı sitrik asit devrinin ve solunum zincirinin metabolik hızlarını aştığı zaman kaslarda meydana gelir. Amino asitler diyette bulunan proteinlerden ve açlık durumunda kas proteinlerinin parçalanmasıyla ortaya çıkar. Gliserol ise, triaçilgliserollerin yağ asitleri ve gliserole hidrolizi ile teşekkül etmektedir. Glukoneogenez yolu, piruvatın glukoza çevrilmesi reaksiyonlarından ibarettir.Başlangıç maddeleri yola piruvat, okzalasetat ve dihidroksiaseton fosfat noktalarından dahil olurlar(Şekil 11.15). Glukoneogenez yolu enzimleri, piruvat karboksilaz (mitokondride) ve glukoz 6-fosfataz (endoplazmik retikuluma yapışık halde) dışında, sitozolde bulunurlar.

Glukoneogenezin vuku bulduğu başlıca yer karaciğerdir. Böbrek korteksinde de önemli oranda glukoneogenez görülmesine rağmen küçük hacminden dolayı karaciğerinkinin onda biri kadardır. Beyin, iskelet kasları ve kalp kasında çok az miktarda glukoneogenez vuku bulur. Zaten karaciğer ve böbrekteki glukoneogenezin gayesi kandaki glukoz seviyesini sabit tutmak ve beyin ile kasların metabolik ihtiyaçlarını karşılamak üzere yeterli glukozu kandan teminine yol açmaktır.



Şekil 11.15. Glukoneogenez yolu. Bu yolun glikolizden farklı reaksiyonlarının okları üzerinde işaret vardır. Diğerleri glikolizle aynıdır.

11.7.a. Glukoneogenezin Reaksiyonları

Glikolizde, glukoz piruvata, glukoneogenezde de piruvat glukoza dönüştürülmektedir. Bununla beraber, glukoneogenez glikolizin dönüşümünden ibaret bir yol değildir. Glikolizin termodinamik dengesi piruvat teşekkülünden çok uzakta olduğu için farklı bir metabolik yol gerekmektedir. Piruvatın glukozdan teşekkülünün gerçek hücre şartlarındaki serbest enerji değişimi (ΔG) -20 kcal/mol'dür. Bu serbest enerji düşüşü, hekzokinaz, fosfofruktokinaz ve piruvat kinaz enzimleri tarafından katalizlenen üç dönüşümsüz reaksiyonda vuku bulmaktadır.

1. Glukoz+ATP $\xrightarrow{\text{Hekzokinaz}}$ Glukoz 6-fosfat+ADP

2. Fruktoz 6-fosfat+ATP $\xrightarrow{\text{Fosfofruktokinaz}}$ Fruktoz 1,6-difosfat+ADP

3. Fosfoenolpiruvat+ADP $\xrightarrow{\text{Piruvat kinaz}}$ Piruvat+ATP

Glukoneogenezde, glikolizin bu dönüşümsüz reaksiyonları dört farklı enzim tarafından katalizlenen reaksiyonların oluşturdukları üç basamakta tersine işliyebilir.

1. Fosfoenolpiruvatın okzalasetat üzerinden piruvattan sentezi: Önce bir ATP harcanmasıyla piruvat karboksile edilir ve okzalasetat teşekkül eder. Daha sonra da okzalasetat dekarboksile edilerek, ikinci bir yüksek enerjili fosfat bağının kullanılmasıyla fosforillenir.

$$\text{Piruvat}+CO_2+\text{ATP}+H_2O \rightleftharpoons \text{Okzalasetat}+\text{ADP}+P_i+2H^+$$
$$\text{Okzalasetat}+\text{GTP} \rightleftharpoons \text{Fosfoenolpiruvat}+\text{GDP}+CO_2$$

İlk reaksiyon piruvat karboksilaz, ikinci reaksiyon da fosfoenolpiruvat karboksikinaz tarafından katalizlenir. Bu reaksiyonların toplamından,

$$\text{Piruvat}+\text{ATP}+\text{GTP}+H_2O \rightleftharpoons \text{Fosfoenolpiruvat}+\text{ADP}+\text{GDP}+P_i+2H^+$$

elde edilir.

Bu reaksiyonun ΔG° değeri+0,2 kcal/mol'dür. Piruvat kinaz tarafından aynı reaksiyonun katalizlenmesinin ΔG° değeri +7,5 kcal/mol olduğu göz önüne alınırsa, bu basamağın yüksek enerjili bir bağın kullanılmasıyla termodinamik yönden uygun hale geldiği görülür.

2. Fruktoz 1,6-difosfatın hidrolizlenerek fruktoz 6-fosfata çevrilmesi: Bu ekzergonik hidroliz reaksiyonu fruktoz 1,6-difosfataz enzimi tarafından katalizlenir.

$$\text{Fruktoz 1,6-difosfat} + H_2O \longrightarrow \text{Fruktoz 6-fosfat} + P_i$$

3. Glukoz 6-fosfatın hidrolizi ile glukozun teşekkülü: Bu reaksiyon glukoz 6-fosfataz enzimi tarafından katalizlenir:

$$\text{Glukoz 6-fosfat} + H_2O \longrightarrow \text{Glukoz} + P_i$$

Glukoz 6-fosfataz endoplazmik retikuluma bağlı olup, sitozoldeki substratlarına etki eder. Bu enzim böbrek ve karaciğer hücrelerinde bol miktarda bulunur. Beyin ve kasta mevcut değildir. Bu dokular sentezledikleri glukozu, glukoz 6-fosfattan itibaren kendileri kullanırlar.

Glukoneogenezin enerji bilançosu: Glukoneogenezin stokiyometrik denklemi şöyledir:

$$2\ \text{Piruvat} + 4\ ATP + 2\ GTP + 2NADH + 2H_2O \longrightarrow$$
$$\text{Glukoz} + 4\ ADP + 2\ GDP + 6\ P_i + 2\ NAD^+ \quad \Delta G^\circ = -9 \text{ kcal/mol}$$

Eğer glukoz sentezi glikolizin dönüşümüyle olsaydı,

$$2ATP + 2\text{Piruvat} + 2NADH + 2\ H_2O \longrightarrow \text{Glukoz} + 2ADP + 2P_i + 2NAD^+ \quad \Delta G^\circ = 20 \text{ kcal/mol}$$

20 kcal/mol'lük bir enerji engeli ortaya çıkacaktı.

Yukarıdaki reaksiyonlarda glukoneogenezle glukoz sentezinde altı yüksek enerjili fosfat bağı kullanılırken, glikolizin dönüşümünde iki molekül ATP harcanmaktadır. Yani glukoneogenezin ekstra masrafı bir glukoz molekülü başına dört adet yüksek enerjili fosfat bağıdır. Bu sayede 20 kcal/mol'lük enerji engeli aşılarak ΔG° değeri -9 kcal/mol olan termodinamik yönden yürüyebilen bir olay meydana getirilmektedir.

Glukoneogenez ve glikoliz yolları koordineli olarak çalışıp, birisi nisbeten inaktif iken, diğeri oldukça aktiftir. Herbir yolun birbirlerinden farklı enzimleri öyle etkilenmektedir ki, iki yol aynı anda aktif olamamaktadır. Meselâ AMP, fosfofruktokinazı uyarırken, fruktoz

1,6-difosfatazı inhibe eder. Sitrat bu enzimler üzerinde zıt etkide bulunur. Piruvat kinaz ve piruvat karboksilaz enzimleri reaksiyonları da birbirlerine zıt etkilerle düzenlenirler. Fruktoz 1,6-difosfat, piruvat kinazı uyarırken, ATP inhibe eder. Piruvat karboksilaz da asetil CoA tarafından stimüle edilirken ADP'nin inhibisyonuna maruz kalır.

11.7.b. Piruvat Karboksilaz Enziminin Allosterik Özellikleri ve Biyotinin Etki Mekanizması

1960 yılında Merton Utter mitokondride piruvattan okzalasetatın sentezlenmesinden hareket ederek, piruvat karboksilaz enzimini keşfetti. Bu enzim, katalitik ve allosterik özellikleri yönünden çok ilgi çekicidir. Piruvat karboksilaz, aktifleşmiş CO_2 taşıyan biyotin prostetik grubunu kovalent bağlamıştır. Biyotinin karboksil ucu enzimin yapısındaki bir lisin rezidüsünün ε-amino grubuna bir amid bağıyla bağlıdır(Şekil 9.9).

Piruvatın karboksilasyonu iki basamakta vuku bulur.

$$\text{Biyotin-enzim+ATP+}HCO_3^- \xrightarrow[Mg^{+2}\ Mn^{+2}]{\text{Asetil CoA}} CO_2\sim\text{Biyotin-enzim+ADP+}P_i$$

$$CO_2\sim\text{Biyotin-enzim+Piruvat} \rightleftharpoons \text{Biyotin-enzim+Okzalasetat}$$

Karboksibiyotin-enzim ara bileşiğinin karboksil grubu, biyotin halkasının 1 no'lu N atomuna bağlıdır. Bu grup aktifleşmiş olup, hidroliz ΔG° değeri -4,7 kcal/mol'dür. Bu da herhangi bir enerji ihtiyacı göstermeden CO_2'nin alıcı moleküllere transfer edilebilmesini mümkün kılar.

Daha sonra bu aktifleşmiş karboksil grubu okzalasetat vermek üzere piruvata transfer edilir. Enzim ile biyotin arasındaki uzun ve esnek bağlantı, bu prostetik grubun enzimin bir aktif bölgesinden ($ATP\text{-}HCO_3^-$ bölgesi) diğerine (piruvat bölgesi) kolayca dönmesini mümkün kılar.

Piruvat karboksilazın aktivitesi asetil CoA'nın mevcudiyetiyle yakından alakalıdır. Asetil CoA (veya çok benzer bir açil CoA) olmaksızın biyotin karboksillenememektedir. İkinci reaksiyon asetil CoA tarafından etkilenmez. Piruvat karboksilazın asetil CoA tarafından allosterik etkilenmesi fizyolojik yönden çok önemlidir. Bu enzim reaksiyonunun ürünü olan okzalasetat, hem glukoneogenezin hem de sitrik asit devrinin ara bileşiğidir. Yüksek seviyedeki asetil CoA daha fazla okzalasetat ihtiyacını gösterir. Eğer ATP fazla ise okzalasetat glukoneogenezde, eğer az ise sitrik asit devrinde kullanılır. Böylece piruvat karboksilaz enzimi yalnız glukoneogenezde değil, sitrik asit devri ara bileşiklerinin seviyesini sabit tutmakla da görevlidir. Bu ara bileşikler, amino asitlerin veya porfirinlerin biyosentezlerinde kullanıldıkları zaman yenilenmeleri icab eder.

Piruvat karboksilaz bir mitokondri enzimi iken, diğer glukoneogenez enzimleri sitoplazmada yer alırlar. Okzalasetat mitokondri membranından sitozole bir NADH-bağlı malat dehidrogenez enzimi tarafından malata dönüştürülerek geçer. Malat, membranda bir taşıyıcı protein vasıtasıyla sitozole aktarıldıktan sonra, tekrar bir NADH-bağlı sitozol malat dehidrogenazı vasıtasıyla okzalasetata yükseltgenir.

11.8. FOTOSENTEZ İLE KARBOHİDRAT SENTEZİ

Biyolojik sistemler tarafından kullanılan serbest enerjinin kaynağı, fotosentez sırasında tutulan güneş enerjisidir. Fotosentezin temel denklemi basitçe aşağıdaki şekilde yazılabilir:

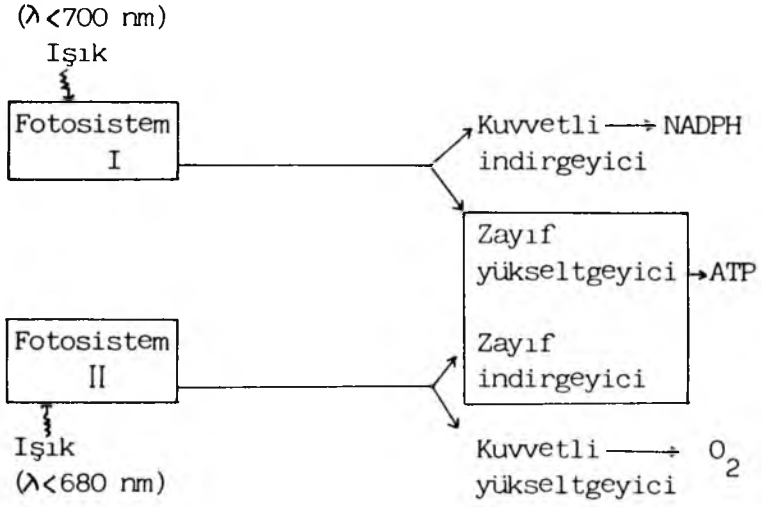
$$H_2O + CO_2 \xrightarrow{\text{Işık}} (CH_2O) + O_2$$

Bu denklemdeki CH_2O formülü karbohidratları temsil etmektedir. Gerçekte fotosentezin mekanizması oldukça komplekstir. Yeşil bitkilerde fotosentez olayı, bu iş için özelleşmiş kloroplast organellerinde cereyan eder.

Fotosentez olayları başlıca 2 kısım halinde ele alınabilir: 1. NADPH ve ATP'nin oluştuğu ışık reaksiyonları, 2. Işık reaksiyonlarında oluşan NADPH ve ATP'nin vasıtasıyla CO_2'nin karbohidratlara ve diğer indirgenmiş ürünlere dönüştürüldüğü karanlık reaksiyonları.

11.8.a. Fotosentezin Işık Reaksiyonları

Yapılan birçok deneysel gözlemler, kloroplastlarda iki farklı foto sistemin mevcut olduğunu göstermiştir. Fotosistem I, 700 nm nin altındaki dalga boylu ışıkla uyarılır; bu sırada kuvvetli bir indirgeyici oluşur ve bu da NADPH'ın teşekkülüne sebep olur. Buna karşılık fotosistem II, 680 nm nin altındaki dalga boylu ışığa ihtiyaç duyar ve O_2 oluşumuna sebep olan kuvvetli bir yükseltgeyici üretir. Ek olarak fotosistem I zayıf bir yükseltgeyici, fotosistem II zayıf bir indirgeyici oluşturur. Bu her iki sistemin karşılıklı etkileşmesi sonunda da ATP meydana gelir (Şekil 11.16). Daniel Arnon tarafından keşfedilen fotosentezin bu bölümü fotosentetik fosforilasyon veya fotofosforilasyon olarak tanımlanır.

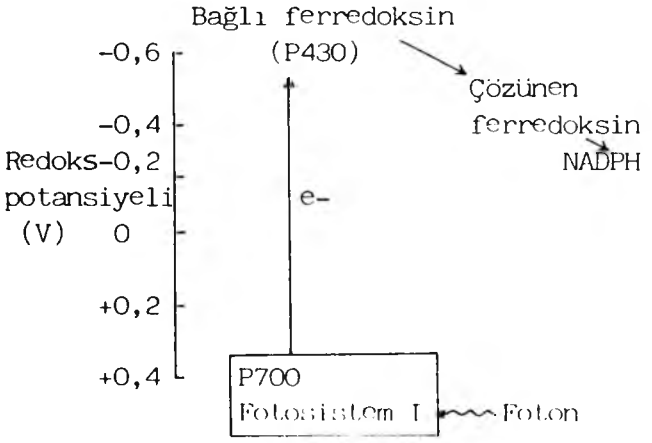


Şekil 11.16. Fotosentezde fotosistem I ve II'nin karşılıklı etkileşmesi.

Fotosistem I ve II yapısal farklılıklar gösterirler. Fotosistem I partiküllerinden 14 molekül klorofil a ve 110 kdal molekül ağırlığında bir protein, fotosistem II partiküllerinden ise 3 molekül klorofil a, 3 molekül klorofil b ve 28 kdal molekül ağırlığında bir protein izole edilmiştir.

Fotosistem I: Fotosistem I'in reaksiyon merkezi özel bir çevrede bulunan klorofil a molekülüdür. Absorbsiyon maksimumu 680'den 700 nm ye kaydığı için, reaksiyon merkezi P 700 (p: pigment) olarak da gösterilebilir. P 700 uyarıldığında bir elektron, membrana bağlı ferredoksin (Fe_4S_4 tipindeki 11,6 kdal molekül ağırlığında bir demir-kükürt proteini)'e aktarılır. Bu sırada P 700'ün redoks potansiyeli +0,4 V'den -0,6 V'a kayar. Membrana bağlı ferredoksin, elektronunu ferredoksinin çözünür formuna aktarır. Bu sırada ferredoksinin aktif merkezindeki demir atomu nöbetleşe yükseltgenir ve indirgenir. İndirgenen ferredoksin, elektronlarını $NADP^+$'ye aktararak NADPH oluşturur (Şekil 11.17). Bu reaksiyon prostetik grup olarak FAD ihtiva eden ferredoksin-$NADP^+$-redüktaz tarafından katalizlenir:

$$2\ \text{Ferredoksin(ind.)} + NADP^+ + H^+ \longrightarrow 2\ \text{Ferredoksin(yük.)} + NADPH$$



Şekil 11.17. Fotosistem I vasıtasıyla NADPH'ın oluşumu.

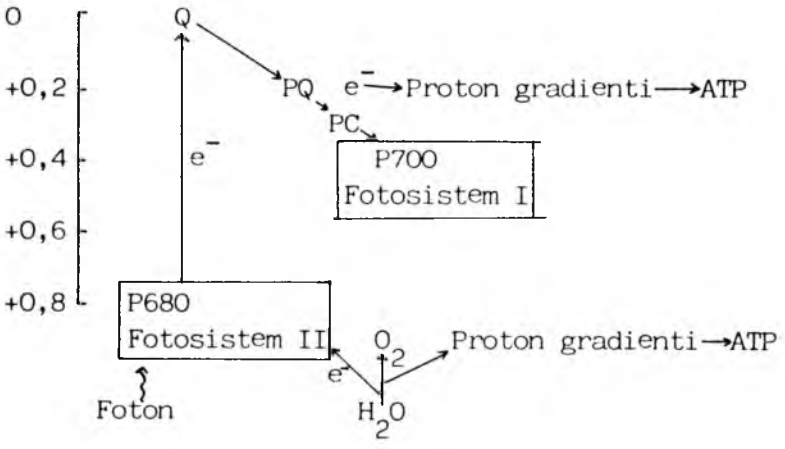
Fotosistem II: Fotosistem II'nin reaksiyon merkezi (P 680) ve primer elektron alıcısı hakkında nisbeten az şey bilinmektedir. Bu reaksiyon merkezinin redoks potansiyeli yaklaşık +0,8 V'dur. Burada ışık, kuvvetli bir yükseltgeyici (Z^+) ve zayıf bir indirgeyici (Q^-) oluşturur. Z^+, elektronları sudan çekerek O_2 oluşturur. Mangan burada önemli bir rol oynar.

$$4Z^+ + 2H_2O \longrightarrow 4Z + 4H^+ + O_2$$

Elektron, fotosistem II'nin ışıkla aktifleştirilmiş reaksiyon merkezinden sıkı bağlı bir molekül olan plastokinona (Q) taşınır. Daha sonra elektron, hareketli plastokinona, bundan da bir integral membran proteini olan sitokrom b_{559}'a aktarılır. Fotosistem II'den I'e elektron taşıyıcı ise, 10,5 kdal molekül ağırlığında tek bir bakır atomlu plastosiyanin proteinidir (Şekil 11.18).

Fotosistem I ve II'nin net reaksiyonu şöyledir:

$$2H_2O + 2NADP^+ \longrightarrow O_2 + 2NADPH + 2H^+$$



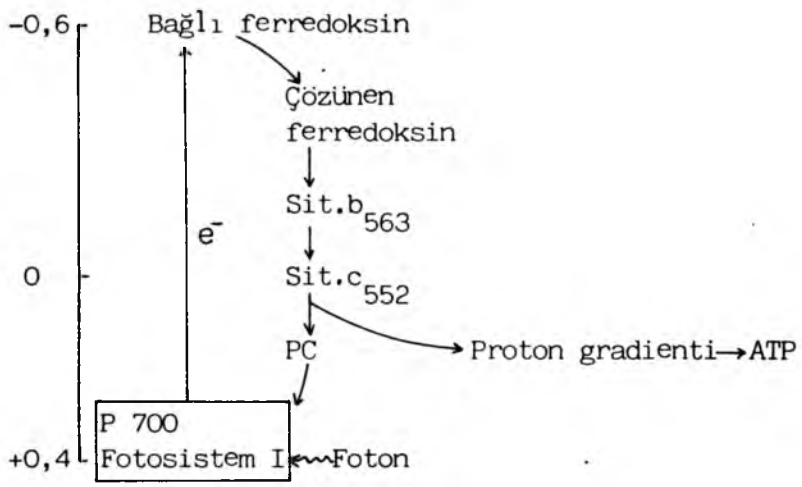
Şekil 11.8. Fotosistem II vasıtasıyla O_2 oluşumu ve bir elektronun fotosistem I'e aktarılması. Bu şekilde tilakoid membranında bir proton gradienti meydana gelir (PQ: plastokinon, PC: plastosiyanin).

Fotofosforilasyon: Kloroplastlardaki ATP sentezinin mekanizması mitokondrilerdekine çok benzerlik gösterir. Her ikisi de proton-motif kuvvetle gerçekleştirilir. Kloroplastlardaki ATP oluşumunu katalizleyen enzim kompleksi, mitokondrilerdeki F_1-F_0-kompleksine benzer şekilde CF_1-CF_0 kompleksidir (C: Kloroplast, F: faktör). CF_1,325 kdal molekül ağırlığında 5 farklı alt birimden oluşur ve ADP ile P_i'den ATP oluşumunu katalizleyen bileşendir. CF_0 ise, üç farklı alt birimden oluşan proton kanalı ihtiva eden bileşendir.

Asimetrik düzenlenen fotosistem I ve II ile elektron transportu, tilakoid membranlarında büyük bir proton gradienti oluşturur. Tilakoid bölgesi asidiktir (pH=4). Işıkla indüklenmiş proton gradienti yaklaşık 3,5 pH birimi kadardır. Proton-motif kuvvet, bir pH gradienti ve bir membran potansiyelinden oluşur. Mitokondrilerde membran potansiyelinin miktarı daha büyük iken, kloroplastlarda protein-motif kuvvetin hemen hemen tamamı pH gradientinden kaynaklanır. Bu farklılığın sebebi, tilakoid membranının Cl^- ve Mg^{+2} için geçirgen olmasıdır. Işıkla indüklenen H^+'nın tilakoid bölgelerine transferi, ya aynı yönde Cl^-'ün transferiyle veya ters yönde Mg^{+2}'nin transferiyle ($2H^+$ başına 1 tane) beraber yürütülür. Elektriksel nötralite muhafaza edildiğinden hiçbir membran potansiyeli oluşmaz. Tilakoid membranında 0,2 V'luk proton-motif kuvvet, mol proton başına yaklaşık 4,8 kcal'ye eşdeğerdedir. Sentez edilen ATP başına CF_1-CF_0 kompleksi arasından yaklaşık 3 proton akışı olur.

Fotofosforilasyon için gerekli olan proton gradientinin fotosistem II'de gerçekleştiğini belirtmiştik. Bu şekilde ATP'nin sentezine **siklik olmayan fotofosforilasyon** denir. Bunun yanında fotosistem I'de de siklik bir elektron akışı sırasında ATP meydana gelebilir. Burada ferredoksinde mevcut olan yüksek potansiyelli elektronlar $NADP^+$ yerine sitokrom b_6 (Sit.b_{563})'ya, daha sonra sırasıyla sitokrom f (sit.c_{552}) ve plastokinona aktarılıp, son olarak da P 700'ün yükseltgenmiş şekline geri döner-

ler. Böylece siklik bir elektron akışı oluşur. Bu sırada oluşan proton gradienti de ATP sentezini netice verir. Bu yüzden bu proses **siklik fotofosforilasyon** olarak ifade edilir (Şekil 11.19). Bu şekilde NADPH yerine ATP meydana gelir. Bu olaya fotosistem II iştirak etmediği için sudan oksijen oluşmaz. NADPH'ın $NADP^+$'ya oranı yüksek olduğu zaman bu olay meydana gelir.

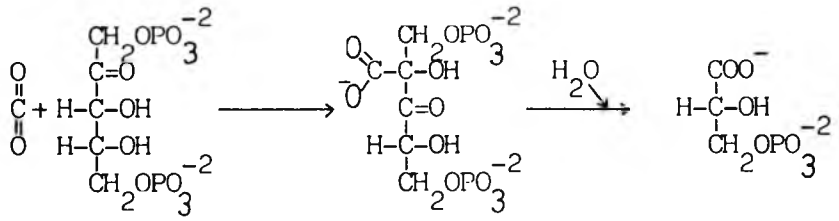


Şekil 11. 19. Siklik fotofosforilasyonda elektron akışı ve ATP sentezi.

11.8.b. Fotosentezin Karanlık Reaksiyonları

Yeşil bitkilerde fotosentezin ışık reaksiyonlarında oluşan NADPH ve ATP, CO_2'nin karbohidratlara ve diğer indirgenmiş ürünlere dönüştürülmesinde kullanılır. Fotosentezin karanlık reaksiyonları olarak ifade edilen bu reaksiyonlar, glukoneogenez ve pentoz fosfat metabolik yollarının büyük bir kısmını ihtiva etmektedirler. Bitkisel fotosentezin en önemli son ürünleri nişasta, selüloz ve diğer polisakkaritlerdir. Yüksek bitkilerin dokularında glukoz serbest halde önemli miktarda bulunmaz .

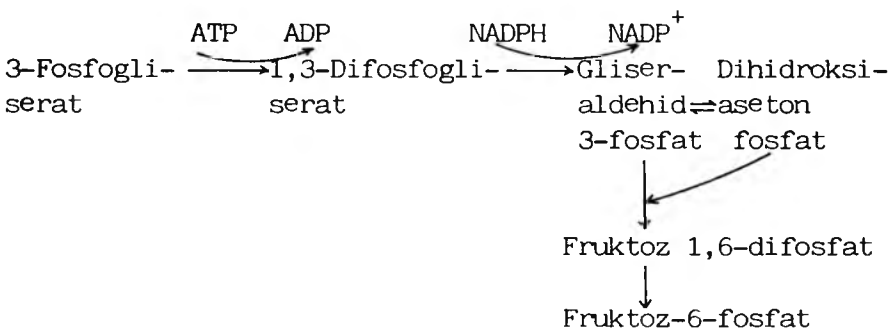
CO_2 molekülü, ribuloz 1,5-difosfatla 6 C'lu bir bileşik oluşturacak şekilde kondanse olur; oluşan bu kararsız bileşik de hemen iki molekül 3-fosfogliserata hidroliz olur. Toplam reaksiyon oldukça ekzergonikdir (ΔG° = -12,4 kcal/mol).



Ribuloz 1,5 difosfat Ara ürün 3-Fosfogliserat

Bu reaksiyon, tilakoid membranlarının stroma tarafında lokalize olan ribuloz 1,5-difosfat karboksilaz enzimince katalizlenir. Bu enzim kloroplastlarda bol miktarda bulunup, toplam proteinlerin yaklaşık % 16'sını teşkil eder. Hatta bu enzimin biosferde en bol bulunan protein olduğu tahmin edilmektedir. 8 büyük (55 kdal) ve 8 küçük (15 kdal) alt birimden oluşmaktadır.

3-Fosfogliserat glukoneogenezdeki basamakları izliyerek fruktoz-6-fosfata dönüşür. Tek fark kloroplastlardaki gliseraldehid 3-fosfat dehidrogenazın NADH yerine NADPH'a spesifik olmasıdır:



Bundan sonra 6 ve 3 karbonlu birimlerden 5 karbonlu karbohidratlar transketolaz ve aldolaz katalizörlüklerinde sentezlenir:

$$\underset{\text{6-fosfat}}{\text{Fruktoz}} + \underset{\text{3-fosfat}}{\text{Gliseraldehid}} \xrightarrow{\text{Transketolaz}} \underset{\text{5-fosfat}}{\text{Ksiluloz}} + \underset{\text{4-fosfat}}{\text{Eritroz}}$$

$$\underset{\text{4-fosfat}}{\text{Eritroz}} + \underset{\text{fosfat}}{\text{Dihidroksiaseton}} \xrightarrow{\text{Aldolaz}} \underset{\text{1,7-difosfat}}{\text{Sedoheptuloz}}$$

$$\underset{\text{7-fosfat}}{\text{Sedoheptuloz}} + \underset{\text{3-fosfat}}{\text{Gliseraldehid}} \xrightarrow{\text{Transketolaz}} \underset{\text{5-fosfat}}{\text{Riboz}} + \underset{\text{5-fosfat}}{\text{Ksiluloz}}$$

Fotosentezin karanlık reaksiyonlarında 4 enzim daha görev alır. Bunlardan birincisi sedoheptuloz 1,7-difosfatı sedoheptuloz 7-fosfata hidroliz eden bir fosfataz; ikincisi, ksiluloz 5-fosfatı ribuloz 5-fosfata dönüştüren fosfopentoz epimeraz; üçüncüsü, riboz 5-fosfatı ribuloz 5-fosfata dönüştüren fosfopentoz izomerazdır.

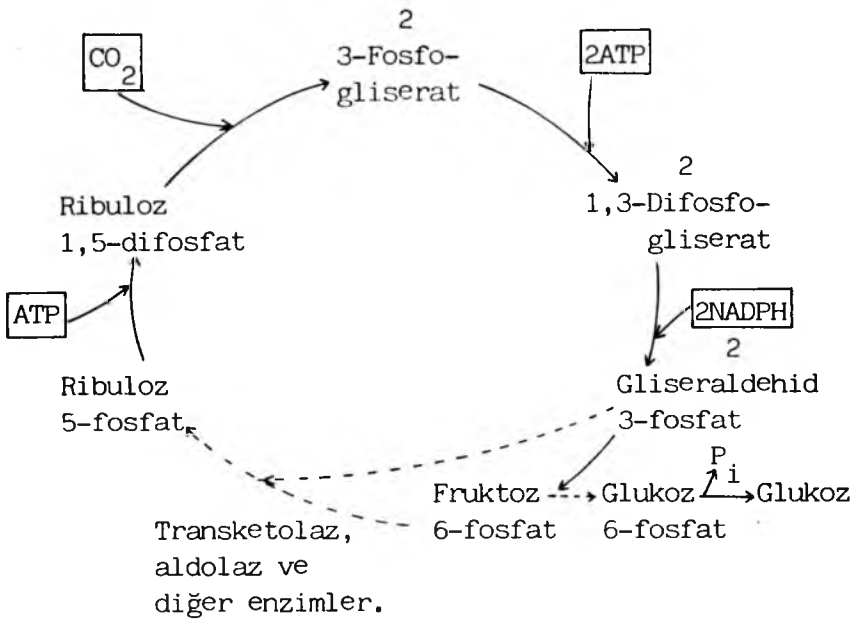
Fruktoz 6-fosfattan itibaren anlatılan reaksiyonların net denklemi şöyledir:

$$\underset{\text{6-fosfat}}{\text{Fruktoz}} + 2\ \underset{\text{3-fosfat}}{\text{Gliseraldehid}} + \underset{\text{fosfat}}{\text{Dihidroksiaseton}} \longrightarrow 3\ \underset{\text{5-fosfat}}{\text{Ribuloz}}$$

Fotosentezin karanlık reaksiyonlarında rol alan son enzim, ribuloz 5-fosfatın ribuloz 1,5-difosfata fosforilasyonunu katalizleyen fosforibuloz kinazdır.

$$\text{Ribuloz 5-fosfat} + \text{ATP} \longrightarrow \text{Ribuloz 1,5-difosfat} + \text{ADP} + H^+$$

Bu reaksiyon serisi Calvin siklüsü diye adlandırılır (Şekil 11.20).



Şekil 11.20. Calvin siklüsü. Ribuloz 5-fosfatın 3 ve 6 karbonlu karbohidratlardan oluşumu bu diyagramda tek tek gösterilmemiştir.

Bir CO_2'nin Calvin siklüsüne dahil olmasının net denklemi şöyledir:

$$\text{Ribuloz 1,5-difosfat} + CO_2 + 3ATP + 2NADPH + 2H^+ + 2H_2O \longrightarrow$$
$$\text{Ribuloz 1,5-difosfat} + (CH_2O) + 3Pi + 3\,ADP + 2\,NADP^+$$

Ribuloz 1,5-difosfat denklemin her iki tarafında olduğundan çıkarılırsa;

$$CO_2 + 3ATP + 2NADPH + 2H^+ + 2H_2O \longrightarrow (CH_2O) + 3P_i + 3ADP + 2NADP^+$$

elde edilir.

Calvin siklüsünün 6 defa cereyan etmesiyle net denklem şu hali alır:

$$6CO_2+18ATP+12NADPH+12H^+ +12H_2O \rightarrow C_6H_{12}O_6+18Pi+18ADP+12NADP^+$$

Calvin siklüsünün hız belirleyen basamağı, ribuloz 1,5-difosfatın karboksilasyon reaksiyonudur. Ribuloz 1,5-difosfat karboksilazın aktivitesi, fotosistem I tarafından oluşturulan NADPH ve Mg^{+2} tarafından artırılır. Aynı zamanda ışıkla indüklenen tilakoid bölgesinin asidik olması stromayı alkali yapar; bu da enzimin aktivitesini artırır.

Ribuloz 1,5-difosfat karboksilazın karboksilaz aktivitesinin yanında oksigenaz aktivitesi de vardır. Bu yolla ribuloz 1,5-difosfat glioksilata dönüşür. Oksigenaz aktivitesi sıcaklıkla karboksilaz aktivitesinden daha hızlı artar. Bu yüzden tropikal bitkiler, CO_2'yi C_4 yolu adı verilen farklı bir mekanizmayla calvin siklüsüne zenginleştirerek sokarlar.

11.9. GLİKOJEN METABOLİZMASI

Hayvanlarda glukozun kolayca mobilize edilerek kullanılabileceği bir depolama şekli olan glikojenin yapısını daha önceden incelemiştik. Glukoz alt birimlerinin $\alpha(1\longrightarrow 4)$ glikozid bağlarıyla oluşturdukları ve yaklaşık on birimde bir $\alpha(1\rightarrow 6)$ dallanmalarının olduğu bir polisakkarit yapısına sahipti.

Glikojenin mevcudiyeti, yemekler arasında veya kas aktivitesi esnasında kullanılabilecek glukoz sağlamada çok önemlidir. 70 kg'lık bir şahısda vücut sıvılarındaki glukoz 40 kcal'lik bir enerji sağlayabilirken, toplam glikojen miktarının enerji karşılığı 600 kcal'den fazla-

dır. Glikojen, başlıca karaciğer ve kaslarda depolanmıştır. Bu dokuların sitozollerinde çapları 100-400 A° arasında değişen granüller halinde bulunan bu polisakkarit, granül yapılarında, yapım ve yıkımında katalizörlük görevi yapan enzimleri de ihtiva ederler. Bu enzimler daha önceden gördüğümüz multienzim sistemlerindeki gibi stokiyometrik bir düzenlilik göstermezler.

Bu bölümde glikojenin sentez ve yıkımını detaylı olarak ele alacağız. Bu konuyu ayrıntılı incelememizin sebepleri şunlardır: Birincisi, bu prosesler kan glukoz seviyesini düzenlemelerinden ve kas aktivitesi için bir glukoz kaynağı olduğundan çok önemlidir. İkincisi, glikojenin sentez ve yıkımı birbirinden farklı mekanizmalarla gerçekleştiğinden metabolizmanın önemli bir özelliğine çarpıcı bir örnek teşkil etmektedir. Üçüncüsü, glikojen metabolizması, canlı organizmadaki olayların hormonal düzenlenmesine çok güzel bir misaldir. Burada siklik adenozin monofosfatın(cAMP) glikojen sentez ve yıkımını nasıl koordineli olarak kontrol ettiği tam olarak anlaşılmıştır. Dördüncü olarak, bugün artık glikojen metabolizmasındaki enzimlerin irsi bozukluklarından ortaya çıkan hastalıkların mahiyeti anlaşılmıştır. Bunlardan bazıları çocuk yaşlarda çok tehlikeli olup, bazıları da tedavi ile geçiştirilebilmektedir.

11.9.a.Glikojenin Yıkımı

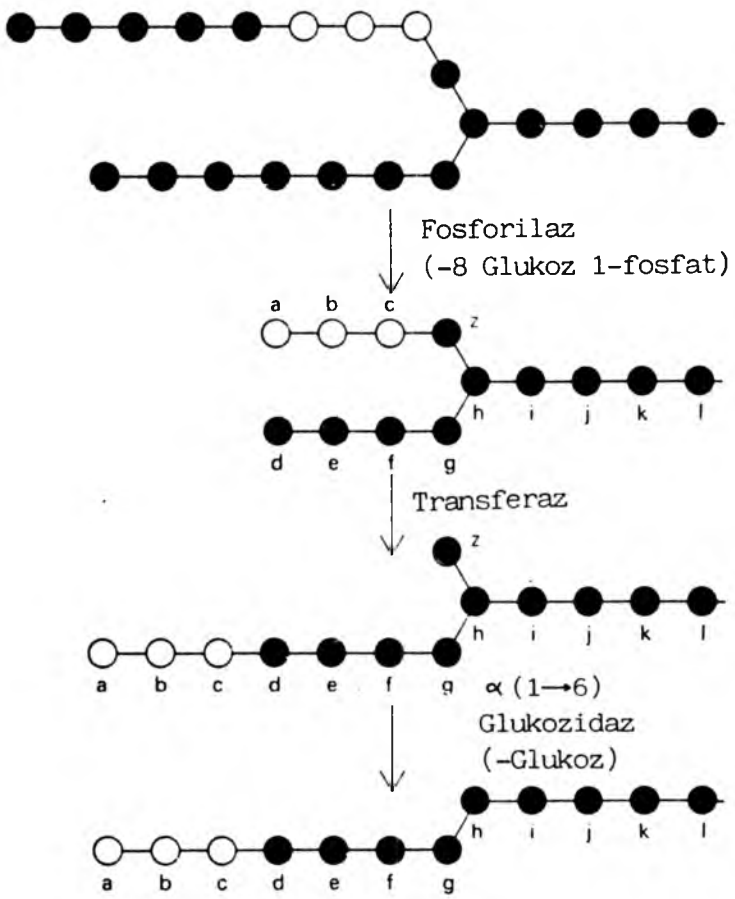
Glikojen yıkımı Carl Cori ve Gerty Cori adlı biyokimyacıların çalışmaları sonucu aydınlatılmıştır. Glikojen, aşağıdaki reaksiyonu katalizleyen glikojen fosforilaz enzimi tarafından glukoz 1-fosfat halinde parçalanmaktadır.

$$\underset{\text{(n birim)}}{\text{Glikojen}} + P_i \rightleftharpoons \text{Glukoz 1-fosfat} + \underset{\text{(n-1 birim)}}{\text{Glikojen}}$$

Fosforilaz enzimi, glikojen molekülünün indirgeyici olmayan ucundan $\alpha(1\longrightarrow 4)$ glikozid bağlarının sırayla koparılmasını katalizler. Bu reaksiyon muhtemelen bir karbonyum iyonu ara bileşiği üzerinden yürümektedir.

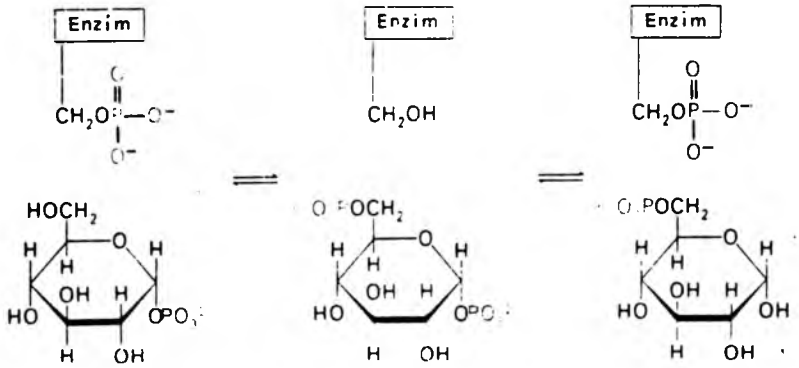
Glikojenin fosforilitik parçalanması, ayrılan glukozun fosforillenmiş olmasından dolayı enerji yönünden avantajlı bir reaksiyondur. Çünkü, glukozun hem glikoliz hem de pentoz fosfat yoluna girerken bir ATP harcanarak fosforillenmesi gerekmektedir. Fosforilli bir ürünün kas hücreleri için bir diğer avantajı da, glukozdan farklı olarak glukoz 1-fosfatın hücre dışına difüzyonla çıkamamasıdır.

Fosforilaz enzimi katalizörlüğünde glikojen sınırlı olarak parçalanabilir. Çünkü dallanma noktalarındaki $\alpha(1\longrightarrow 6)$ glikozid bağları bu enzimin substratı değildir. Dallanma noktasına dört birim kala fosforilaz parçalamayı durdurur. Şekil 11.21'de glikojen yıkımı basamak basamak gösterilmiştir. Burada önce bir daldaki beş, diğer daldaki üç $\alpha(1\longrightarrow 4)$ glikozid bağı fosforilaz tarafından parçalanır. Parçalanma bu noktada durur. Çünkü a ve d birimleri 4 dallanma noktasından dört birim beridedirler. Bu safhada yeni bir enzim gerekmektedir. Dış daldaki üç birimi diğerine transfer etme görevini yerine getirecek bu enzim bir transferazdır. Burada c ve z arasında $\alpha(1\longrightarrow 4)$ bağı koparılırken, c ve d arasında yeni bir bağ oluşturulur. Bu transfer neticesinde z birimi yeni bir enzimin, $\alpha(1\longrightarrow 6)$ glukozidazın etkisine maruz kalacak şekle girmiştir. Bu enzim z ile h arasındaki $\alpha(1\longrightarrow 6)$ bağını koparır. Böylece transferaz ve $\alpha(1\longrightarrow 6)$ glukozidaz enzimlerinin etkisi sonucu lineer bir yapı ortaya çıkar ve bu da "1" birimine kadar fosforilaz tarafından parçalanır. Transferaz ve $\alpha(1\longrightarrow 6)$ glukozidaz ayrı ayrı enzimler değildir. Bu enzim aktiviteleri, 160 kdal'lık tek bir polipeptid zinciri üzerinde iki farklı katalitik bölge tarafından yerine getirilir.



Şekil 11.21. Glikojen parçalanması basamakları ve ∝(1→6) glukozidaz reaksiyonu.

Glikojenin fosforilitik parçalanmasıyla oluşan glukoz 1-fosfat, fosfoglukomutaz enzimi katalizörlüğünde glukoz 6-fosfata çevrilir. Denge karışımının % 95'i glukoz 6-fosfattır. Aktif enzim molekülünün katalitik bölgesi, fosfat bağlanmış bir serin ihtiva eder. Kataliz olayı esnasında bu fosfat muhtemelen glukozun C-6'sındaki hidroksile transfer edilerek glukoz 1,6-difosfat teşekkül eder. Daha sonra bu ara bileşik, C-1 fosforil grubunu enzimin serin hidroksiline devreder.



Karaciğerin başlıca fonksiyonu kanda nisbeten sabit bir glukoz seviyesi tesis etmektir. Bu maksatla kas faaliyeti esnasında ve yemek aralarında kana glukoz salıverir. Daha önceden, fosforilli glukozun hücre dışına glukoz gibi difüze olamıyacağını, bundan dolayı fosforil grubunun hidrolizlenmesi gerektiğini belirtmiştik. Bu hidroliz reaksiyonu glukoneogenez için de gerekli olan glukoz 6-fosfataz enzimi tarafından katalizlenir:

$$\text{Glukoz 6-fosfat} + H_2O \longrightarrow \text{Glukoz} + P_i$$

Bu enzim böbrek ve bağırsakta da mevcuttur.

11.9.b. Glikojen Sentezi

Glikojen fosforilaz enziminin katalizlediği reaksiyon in vitro kolayca dönüşebilir bir olaydır, çünkü glikojenin, glukoz 1-fosfat vasıtasıyla uzaması için ΔG° de-

ğeri -0,5 kcal/mol'dür. Gerçekten Cori'ler glikojen fosforilaz ve dallanma enzimi kullanarak glukoz 1-fosfattan glikojen sentezine muvaffak olmuşlardır. Bununla beraber, daha sonra yapılan araştırmalar glikojenin in vivo olarak başka bir mekanizma ile sentezlendiğini göstermiştir. Meselâ fosforilaz tarafından sentezlenen reaksiyon P_i/ glukoz 1-fosfat oranı 3,6 iken dengededir. Fakat, hücre içinde bu oran 100'den büyük olduğundan bu reaksiyon glikojen parçalanması yönünde yürür. İkinci olarak, fosforilaz aktivitesini artıran hormonlar, glikojen yıkımını daima ilerletmektedir. Üçüncü olarak, kas fosforilaz enzimine sahip olmayan hastalarda kas glikojeni sentezlenebilmektedir. Bütün bunlar glikojen sentezinin in vivo olarak başka bir yolla gerçekleştiğini göstermektedir.

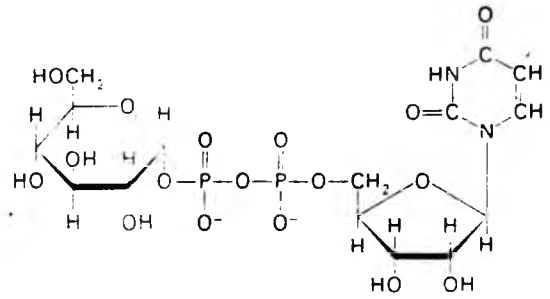
1957 yılında Luis Leloir ve arkadaşları glukozun glikojene, üridin difosfat glukoz (UDP-glukoz)'un parçalanması sonucu takıldığını göstermişlerdir. Yani sentez reaksiyonu yıkımın dönüşümü değildir.

$$\text{Sentez: Glikojen (n birim) + UDP-glukoz} \longrightarrow \text{Glikojen (n+1 birim) + UDP}$$

$$\text{Yıkım: Glikojen (n+1 birim) + } P_i \longrightarrow \text{Glikojen (n birim) + Glukoz 1-fosfat}$$

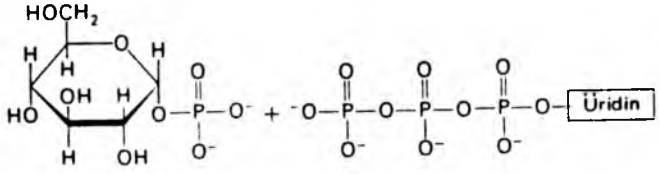
Daha önceden glukoneogenez olayında gördüğümüz gibi, biyolojik sistemlerde biyosentez ve yıkım yolları hemen hemen tamamen farklıdır. Glikojen metabolizması buna çok güzel bir örnektir. Ayrı yollar, hem enerji hem de kontrol noktasından esneklik sağlamaktadır.

Glikojen biyosentezinde glukoz vericisi görevini üslenen UDP-glukoz, aynen ATP ve asetil CoA'nın ortofosfat ve asetatın aktifleşmiş hali olduğu gibi, glukozun aktifleşmiş şeklidir. Glukozun 1 nolu karbonuna bağlı hidroksil grubu, UDP'nin difosfat kısmına ester bağı yaparak yüksek transfer potansiyeline sahip olur.

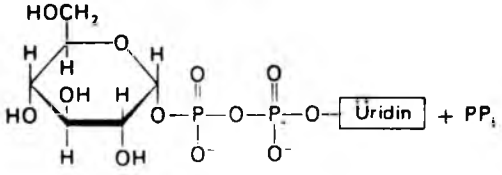


UDP-Glukoz

UDP-glukoz, glukoz 1-fosfat ve üridin trifosfat (UTP)'dan UDP-glukoz pirofosforilaz enzimi tarafından katalizlenen bir reaksiyon sonucu sentezlenir. Bu reaksiyonda açığa çıkan pirofosfat UTP ye aittir.



Glukoz 1-fosfat



UDP-Glukoz

Bu reaksiyon kolayca dönüşebilir. Fakat pirofosfat hemen bir inorganik pirofosfataz enzimi tarafından hidrolizlenir. Dönüşümsüz pirofosfat hidrolizi sonucu açığa çıkan enerji, UDP-glukoz sentezi lehine yukarıdaki reaksiyonu yürütür.

$$\text{Glukoz 1-fosfat} + \text{UTP} \rightleftharpoons \text{UDP-glukoz} + PP_i$$

$$PP_i + H_2O \longrightarrow 2P_i$$

$$\text{Glukoz 1-fosfat} + \text{UTP} + H_2O \longrightarrow \text{UDP-glukoz} + 2\,P_i$$

Bu reaksiyon biyokimyada çok rastlanan bir temel olaya, yani birçok biyosentez olaylarının pirofosfat hidrolizi ile yürümesine misaldir. Aynı zamanda birçok disakkarit ve polisakkaritlerin biyosentezinde glikozil vericisi olarak görev yapan nükleosit difosfat şekerlere bir misaldir.

Yeni glukoz birimleri glikojenin indirgeyici olmayan ucuna eklenir. Aktifleşmiş glikozil birimi glikojenin C-4 karbonundaki hidroksile aktarılarak bir $\alpha(1\longrightarrow4)$ glikozid bağı teşekkül eder. Bu reaksiyon glikojen sentetaz enzimi tarafından katalizlenir. Bu enzim glukoz birimlerini yalnız dörtten fazla rezidü ihtiva eden zincirlere ilâve edebilir. Bu durumda glikojen sentezi için başka sentetazların oluşturdukları ve primer adı verilen bir zincir gerekmektedir.

Glikojen sentetaz, yalnız $\alpha(1\longrightarrow4)$ bağlarının oluşumunu katalizler. $\alpha(1\longrightarrow6)$ dallanma bağları için başka bir enzim lazımdır. Dallanma glikojenin çözünürlüğünün artması için gereklidir. Aynı zamanda fosforilaz ve sentetaz enzimlerinin etki edebileceği çok sayıda indirgeyici olmayan uçlar da meydana gelir. Netice olarak dallanma, glikojen sentez ve yıkım hızını artırır.

Şimdi, glukoz 6-fosfatın glikojene ve tekrar glukoz 6-fosfata çevrilmesi olayının enerji maliyetini hesaplayalım. Bu hesaplarımızda UTP'nin bir ATP kullanarak nükleosit difosfokinaz enzimi katalizörlüğünde UDP'den teşekkül reaksiyonunu kullanacağız.

(1) Glukoz 6-fosfat $\longrightarrow$ Glukoz 1-fosfat

(2) Glukoz 1-fosfat+UTP $\longrightarrow$ UDP-glukoz+PP_i

(3) $PP_i+H_2O \longrightarrow 2P_i$

(4) UDP-glukoz+Glikojen $\longrightarrow$ Glikojen+UDP
(n birim) (n+1 birim)

(5) UDP+ATP $\longrightarrow$ UTP+ADP

Toplam: Glukoz 6-fosfat+ATP+Glikojen+$H_2O\longrightarrow$
(n birim)

Glikojen + ADP + $2P_i$
(n+1 birim)

Sonuç olarak glukoz 6-fosfatın glikojene dahil edilmesi olayında bir adet yüksek enerjili fosfat bağı kullanılır. Glikojen yıkımından elde edilen enerji verimi çok yüksektir. Rezidülerin yaklaşık % 90'ı fosforilitik olarak glukoz 1-fosfata parçalanır ve bu da hiçbir enerji maliyeti olmaksızın glukoz 6-fosfata çevrilir. Geride kalan % 10'u ise dallanma rezidüleri olup, glukoz birimlerine hidrolizlendiklerinden herbiri bir ATP kullanarak glukoz 6-fosfata dönüşebilir. Bunun da tam oksidasyonu sonucu 37 ATP molekülü ortaya çıktığını ve depolanmanın glukoz 6-fosfat başına birden biraz fazla ATP'ye maloldu-ğu gözönüne alınırsa glikojen şeklinde depolanmanın % 97 verimli bir proses olduğu ortaya çıkar.

Glikojenin sentez ve yıkımının ayrı ayrı yollarla gerçekleşmesi bu olayların kolay kontrol edilmelerini sağlar. Eğer her iki prosesin enzimleri aynı anda aktif olsaydı, çok miktarda ATP boş yere hidrolizlenecekti. Gerçekten glikojen sentetaz ve fosforilaz enzimlerinden birisi tam aktif iken, diğeri inaktif olmaktadır. Bu iki metabolik yol insulin, adrenalin ve glukagon hormonlarınca kontrol edilmektedir. Kontrol mekanizması hormonlar konusunda (18. Bölüm) izah edileceğinden burada anlatılmamıştır.

12. BÖLÜM: L İ P İ D M E T A B O L İ Z M A S I

Bu bölümde daha önceden yapılarını incelediğimiz ve lipidler sınıfında yer alan yağ asitlerinin oksidasyonunu ve sentezini ele alacağız. Daha sonra kolesterol metabolizmasını ve gliseridlerle fosfolipidlerin biyosentezini inceleyeceğiz. Başlangıçta yağların sindirimini anlatarak karbohidrat metabolizmasında başlattığımız tarzımızı sürdüreceğiz.

12.1. YAĞLARIN SİNDİRİMİ VE TAŞINMASI

Gıda maddeleri vasıtasıyla alınan yağların çoğunluğunu nötral yağlar teşkil eder. Bunun yanısıra fosfolipidler ve kolesterol de bol miktarda alınır.

Daha önceden izah edildiği gibi, nötral yağlar bitki ve hayvanlarda yağların depo şekli olup, yağ asitlerinin gliserolle yapmış oldukları mono-, di- veya triaçil gliserol esterleridir. Triaçilgliseroller (trigliseridler, nötral yağlar) metabolik enerjinin en verimli ve konsantre depolanma tarzıdır. 1 gram karbohidrat ve protein 4 kcal'lik bir enerji sağlarken, 1 gram yağın oksidasyonu ile 9 kcal'lik bir enerji açığa çıkar. Çünkü yağlar, karbohidratlar ve proteinlere nazaran daha indirgenmişlerdir. Bunun yanısıra yağlar çok apolar olduklarından susuz depolanırlar. Fakat proteinler ve karbohidratlar polar yapılarından dolayı hidratlanmış şekilde stok edilirler. Meselâ, 1 gram glikojen 2 gram su bağlar. Bunun sonucu olarak bir gram susuz yağ, hidratlanmış 1 gram glikojenden 6 kat daha fazla metabolik enerji depolayabilir. Bu da enerjinin glikojen yerine triaçilgliseroller halinde stoklanmasını daha avantajlı kılmaktadır. 70 kg ağırlığında bir erişkinin metabolik enerji rezervlerinin yaklaşık 100.000 kcal'si trigliseridler, 25.000 kcal'si çoğunluğu kaslarda olmak üzere proteinler, 600 kcal'si glikojen ve 40 kcal'si glukoz halindedir. Toplam vücut ağırlığının yaklaşık 11 kg'ı triaçilgliseroldür. Eğer bu miktar enerji glikojen halinde depolansaydı, vücut ağırlığı 55 kg daha fazla olacaktı.

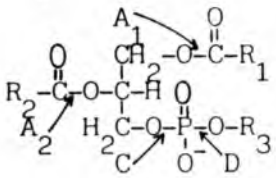
Memelilerde triaçilgliserollerin yığıldığı doku adipoz doku, yani yağ dokusudur. Bu doku hücreleri hacminin büyük bölümünü trigliserit kütleleri oluşturmaktadır. Bu hücreler triaçilgliserollerin sentez, depolanma ve mobilizasyonu için özelleşmiştir.

Diyetle alınan yağlar ince bağırsağın üst kısmına girdiği zaman kolesistokinin hormonu salgılanarak kana karışır ve bu da safra kesesinden bağırsağa safra sıvısının salınmasını uyarır. Safra sıvısının büyük kısmını teşkil eden safra asitleri, kolesterolün polar türevleri olup, hem polar hem de apolar kısımları sayesinde son derece etkili deterjan özelliği gösterirler. Karaciğerde sentezlenirler ve safra kesesinde toplanarak depolanırlar. Safra asitleri suda çözünmeyen lipidleri dağıtarak emülsiyon oluştururlar. Bu sayede lipidlerin lipaz enzimleri tarafından etkilenmesi için uygun fiziksel hal meydana getirilmiş olur.

Yağlar, oniki parmak bağırsağından (duodenum) geçerken sekretin hormonunun salgılanmasını uyarır. Bu hormon da pankreas sıvısının bağırsaklara salınmasını sağlar. Pankreas salgısı, trigliseridler üzerindeki ester bağlarını hidrolizleyen lipaz enzimlerini ihtiva eder. Lipaz enzimlerinin etkisi sonucu yağ asitleri, sabunlar, gliserol ve mono-, di- ve trigliseridlerden ibaret bir karışım ortaya çıkar.

10-12 karbon zincirinden daha kısa yağ asitleri bağırsak duvarı tarafından emilir ve taşıyıcı kan dolaşımı vasıtasıyla karaciğere taşınır. Daha uzun yağ asitleri ve farklı gliserid esterleri, bağırsak mukozasında triaçilgliserollere ve fosfolipidlere çevrilir ve lenf sistemi tarafından kana taşınır.

Fosfolipidler bağırsaklarda fosfolipazlar tarafından hidrolizlenir. Bu enzimler aşağıda gösterilen bağları parçalama tipine göre sınıflandırılırlar:



A_1,A_2, C ve D fosfolipazların hidrolizledikleri bağlar yukarıda gösterilmiştir. Bu enzimlerden, aynen tripsin, trombin gibi proteolitik enzimlerin proteinlerin amino asit sıra ve bileşenlerinin tayininde kullanılması gibi, biyolojik membranların ve onların fosfolipid terkiplerinin belirlenmesinde yararlanılmaktadır. Fosfolipidler emilme esnasında bağırsak mukozasında tekrar sentezlenebildikleri gibi, hiçbir değişikliğe uğramadan da lenf sistemi tarafından absorbe edilebilmektedir.

Kolesterol ise herhangi bir değişikliğe maruz kalmadan ince bağırsak tarafından emilerek lenf sistemine geçer. Burada kolesterol esterleşmiş olarak bulunur.

Normal bir yemek sonrası kanda bir hiperlipemi müşahede edilir. Bu, iki saatı maksimumda olmak üzere 4-5 saat sürer. Yağın bir kısmı şilomikron adı verilen mikroskopik parçacıklar halinde bulunur. Bu parçacıkların çapı 35mμ-1μ arasında olup, az oranda protein, fosfolipid ve kolesterol tarafından stabilize edilir. Şilomikronlar plazmaya bulanık görünüm verirler. Bu bulanık plazma muhtelif organlardan geçerken, kliring faktör (berraklaştırma faktörü) veya lipoprotein lipaz adı verilen bir enzim tarafından berraklaştırılır. Lipoprotein lipaz dokuların bir çoğunda yüksek oranda mevcut olup, heparin tarafından stimüle edilir.

Kolesterol, triaçilgilseroller ve diğer lipidler vücut sıvılarında artan yoğunluklarına göre sınıflandırılan bir seri lipoproteinler tarafından taşınır (Tablo 12.1): yukarıda söz ettiğimiz şilomikronlar, çok düşük dansiteli lipoproteinler (VLDL, very low density lipoproteins), düşük dansiteli lipoproteinler (LDL, low density

lipoproteins) ve yüksek dansiteli lipoproteinler (HDL, high density lipoproteins). Bu lipoproteinler polar lipidler tarafından sarılmış bir hidrofobik lipid çekirdeğinden ve bunun etrafında da apoproteinlerden ibaret bir kabuktan müteşekkildir. Sekiz çeşit apoprotein izole edilmiş ve özellikleri belirlenmiştir: apo A-1, A-II, B, C-I, C-II, C-III, D ve E. Bu kompleksler son derece hidrofobik lipidleri çözünebilir hale getirir. Bunun yanısıra lipoproteinlerin protein bileşenleri spesifik hedeflerde belirli lipidlerin giriş ve çıkışlarını düzenleyen işaretleri de ihtiva ederler.

Plazma lipoproteinleri karaciğer ve bağırsaklarda sentezlenir ve salgılanırlar. Bunların en büyüğü olan şilomikronlar, diyetle alınan triaçilgliserolleri ve diğer lipidleri bağırsaktan karaciğere ve adipoz dokuya taşırlar. Çok miktarda triaçilgliserol ve düşük oranda (% 2'den az) protein ihtiva ettiklerinden dansiteleri çok düşüktür (<0,94). Şilomikronlardaki triaçilgliseroller, adipoz ve diğer periferal dokulardaki lipazlar tarafından birkaç dakika içinde hidrolizlenirler. Kolesterolce zengin kısımları karaciğer tarafından alınır. Çok düşük dansiteli lipoproteinler başlıca karaciğerde sentezlenir. VLDL vücutta sentezlenmiş olan triaçilgliserolleri adipoz dokuya ulaştırır. VLDL'den geriye kalan kısım kolesterol

Tablo 12.1. Plazma lipoproteinleri.

Lipoprotein çeşidi	Yoğunluğu (g/cm^3)	Başlıca polipeptidler
Şilomikronlar	<0,94	apo A,B,C
VLDL	0,940-1,006	apo B,C,E
LDL	1,006-1,063	apo B
HDL	1,063-1,210	apo A

esterlerince zengin olan düşük dansiteli lipoproteinlere dönüştürülür. LDL'deki kolesterolün çoğunluğu linoleatla ester bağı yapmıştır. LDL'nin görevi kolesterolu perife-

ral dokulara taşımak ve buralarda yeniden kolesterol sentezini düzenlemektir. Yüksek dansiteli lipoproteinler de karaciğerde sentezlenir ve yüksek oranda fosfolipid ve kolesterol ihtiva eder. HDL'nin vazifelerinden biri periferal dokulardan kolesterolu karaciğere taşımaktır.

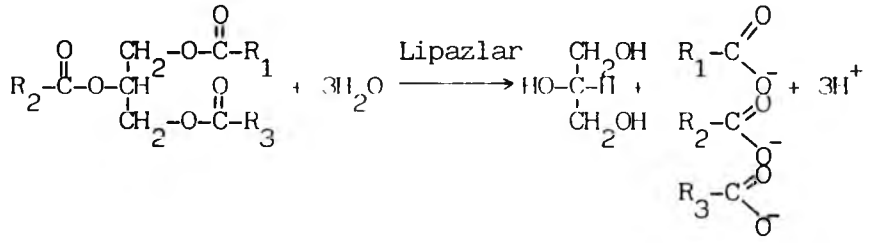
Herhangi bir andaki plazma lipid seviyeleri, lipid metabolizmasının ve diyet rezerv yağlarının kullanım dengesinin genel durumu hakkında bilgi verir. Tablo 12.2'de normal bir erişkinin plazmasındaki başlıca lipidlerin açlık seviyeleri yaklaşık olarak sıralanmıştır.

Tablo 12.2. Plazma açlık lipid seviyeleri (mg/100 ml plazma).

Toplam lipid	450-725
Trigliseridler	30-140
Fosfolipidler	140-225
Toplam kolesterol	140-280
Esterleşmiş kolesterol	Toplam kolesterolun % 70-78'i

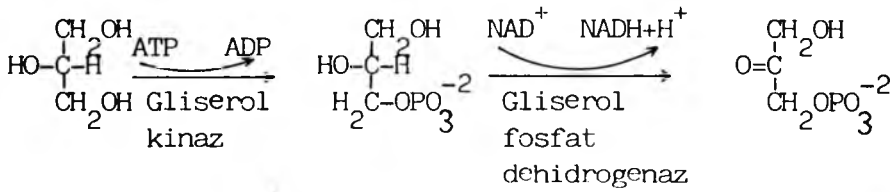
12.2. YAĞ ASİTLERİNİN OKSİDASYONU

Yağ asitleri vücutta triaçilgliseroller halinde depo edildiklerinden, yıkımlarından önce lipaz enzimleri tarafından hidrolizlenirler. Yağ hücreleri lipazının aktivitesi hormonal kontrol altındadır.



Lipoliz neticesi ortaya çıkan gliserol fosforille-

nir ve dihidroksiaseton fosfata yükseltgenir. Daha sonra gliseraldehid 3-fosfata izomerize edilir. Bu bileşik hem glikoliz, hem de glukoneogenez ara maddesidir ve bu enzimleri ihtiva eden karaciğerde piruvat veya glukoza dönüştürülür. Bu proses dihidroksiaseton fosfatın gliserol 3-fosfata indirgenmesi ve bunun da bir fosfataz tarafından hidrolizlenmesiyle gliserole dönüşmesi şeklinde tersine de işleyebilir. Sonuç olarak gliserol ve glikoliz ara ürünleri birbirlerine dönüşebilir.

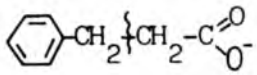


Gliserol | L-Gliserol 3-fosfat | Dihidroksi-aseton fosfat

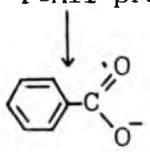
1904 yılında Franz Knoop yağ asidi oksidasyonu mekanizmasını aydınlatmada büyük katkıları olan bir seri deneyler yaptı. Köpeklere w-karbon atomuna fenil takılmış düz zincirli yağ asitleri verdi. Knoop, fenil bütiratla beslenen köpeklerin idrarında bir fenil asetik asit türevi, fenil propiyanatla beslenenlerin idrarında ise, bir benzoik asit türevi tesbit etti. Gerçekten çift karbon sayılı yağ asitleri verildiği zaman fenilasetik asit, tek karbon sayılı yağ asitleri verildiği zaman da benzoik asit oluşmaktaydı. Knoop bu buluşlarından sonra yağ asitlerinin β-karbonu üzerinden yıkıldığı sonucuna varmıştı (Şekil 12.1).

Knoop tarafından gerçekleştirilen bu deneyler, biyokimya tarihinde radyoaktif olmayan işaretli bileşiklerle yapılan ilk çalışmadır. Döteryum ve radyoizotoplar biyokimyasal araştırmalarda bundan 20-30 sene sonra kullanılmaya başlanmıştır.

Tek karbon sayılı yağ asidi

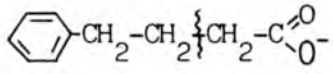


Fenil propiyonat

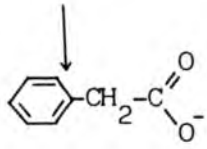


Benzoat

Çift karbon sayılı yağ asidi



Fenil bütirat



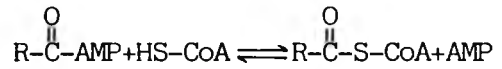
Fenil asetat

Şekil 12.1. Knoop'un yağ asitlerinin ikişer karbon birimi uzaklaştırılmasıyla yıkıldığını gösteren deneyi.

12.2.a. Yağ Asitlerinin Aktifleştirilmeleri ve Mitokondri Matriksine Taşınmaları

1949 yılında, Eugene Kennedy ve Albert Lehninger yağ asitlerinin mitokondrilerde oksitlendiğini gösterdiler. Daha sonraki araştırmalar yağ asitlerinin mitokondri matriksine dahil olmadan önce aktifleştirildiklerini ortaya koymuştur. Aktifleştirilme prosesi, bir ATP'nin AMP' ye kadar hidrolizlenmesi sonucu, bir yağ asidinin karboksil grubuyla CoA'nın sülfhidril grubunun bir tiyoester bağı oluşturması sonucu gerçekleşir. Bu reaksiyon, mitokondri membranı üzerinde bulunan açil CoA sentetaz enzimi (diğer adı yağ asidi tiyokinaz) tarafından katalizlenir ve iki basamakta gerçekleşir. Önce yağ asidi bir açil adenilat, teşkil etmek üzere ATP ile reaksiyona girer. Açil adenilat, yağ asidi karboksil grubunun AMP'nin fosforil grubuna bağlanarak oluşturduğu bir karışık anhidriddir. ATP'nin diğer iki fosforil grubu pirofosfat olarak ayrılır. Daha sonra CoA'nın sülfhidril grubu, enzime sıkıca bağlanmış olan açil adenilatla reaksiyona girerek açil CoA ve AMP'yi meydana getirir:

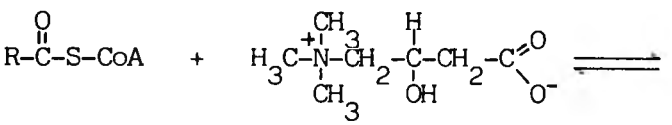
Yağ asidi Açil adenilat



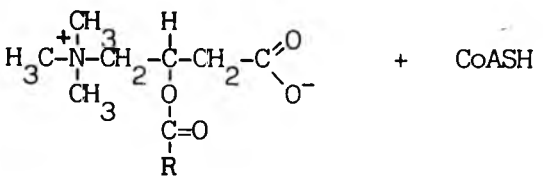
Bu kısmi reaksiyonlar dönüşebilir özelliktedir. Fakat birinci basamakta oluşan pirofosfatın hidrolizi bu reaksiyonu büyük ölçüde ürünler lehine çevirerek dönüşümsüz yapar.

Bu aktifleştirme reaksiyonunda, biyokimyasal olaylarda çok sık rastlanan bir durum tekrarlanmaktadır. Açil adenilatlar diğer biyokimyasal reaksiyonlarda da karboksil gruplarının aktifleştirilmesi proseslerinde teşekkül etmektedir. Meselâ protein sentezi için amino asitler aynı mekanizma ile aktifleştirilmektedir.

Yağ asitleri dış mitokondri membranı üzerinde aktifleştirilirken, mitokondri matriksinde oksitlenirler. Uzun zincirli açil CoA molekülleri iç mitokondri zarından geçemezler ve matrikse özel bir transport mekanizmasıyla, yani karnitin adı verilen polar bir bileşiğe bağlanarak dahil olurlar. Önce açil grubu, CoA'nın kükürt atomundan karnitinin hidroksil grubuna aktarılır. Böylece açil karnitin oluşur. Bu reaksiyon, iç mitokondri membranının sitozol tarafında lokalize olmuş karnitin açiltransferaz I tarafından kataliz edilir.

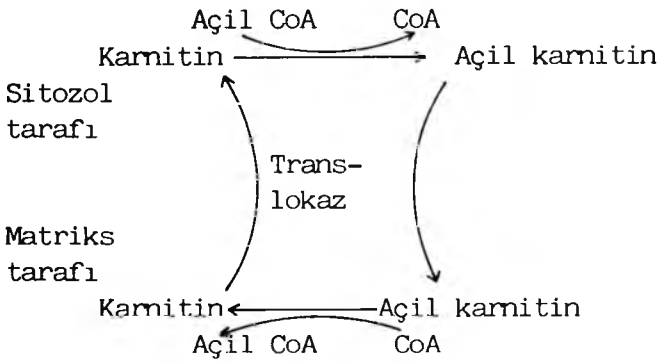


Açil CoA Karnitin



Açil karnitin

Daha sonra açil karnitin iç mitokondri zarından translokaz enzimi aracılığıyla matrikse taşınır. Açil grubu, membranın matriks tarafında tekrar CoA'ya transfer olur. Karnitin açiltransferaz II tarafından katalizlenen bu reaksiyon termodinamik yönden mümkündür, çünkü karnitindeki O-açil bağlantısı yüksek bir grup transfer potansiyeline sahiptir. Son olarak, karnitin translokaz tarafından sitozol tarafına geri döner (Şekil 12.2).

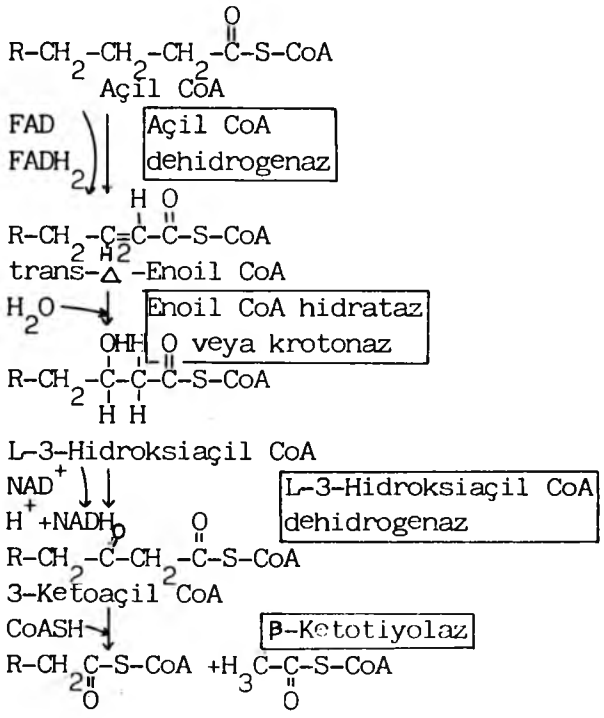


Şekil 12.2. Bir translokaz vasıtasıyla açil karnitinin mitokondrial matrikse girişi ve karnitinin iç mitokondri membranının sitozol tarafına geri dönüşü.

Transferaz veya translokaz enzimlerindeki bir arızanın veya karnitin yetersizliğinin uzun zincirli yağ asitleri oksidasyonunu bozması beklenir. Böyle bir duruma ikiz kardeşlerin ilk çocukluk devresinde rastlanmış, acı verici kas krampları görülmüştür. Acılar açlık ve ekzersiz durumunda veya yağ oranı yüksek diyet alındığında artmıştır. Bu üç durumda da en önemli enerji üreten proses yağ asidi oksidasyonudur. Glikoliz ve glikojenoliz enzimleri, triaçilgliserollerin lipolizi normal bulunmuştur. Kas biyopsisi ile uzun zincirli açil CoA sentetaz enziminin tam aktif olduğu anlaşılmıştır. Bunun yanısıra, orta uzunluktaki (C_8-C_{10}) yağ asitlerinin normal olarak metabolize edildikleri de tesbit edilmiştir. Çünkü orta uzunlukta açil CoA'ların matrikse geçmesi için karnitin gerekmemektedir. Bu vaka raporu, hücrenin bir bölmesinden diğerine geçişin bozuk oluşundan dolayı da bir hastalığın ortaya çıkabileceğini göstermektedir.

12.2.b. Doymuş Yağ Asitlerinin β-Oksidasyonu

Mitokondri içine alınan bir doymuş açil CoA, dört reaksiyonun tekrarlanmasıyla yakılmaktadır: 1) FAD'ye bağlı bir oksidasyon, 2) Hidrasyon, 3) NAD^+'ye bağlı ikinci bir oksidasyon ve 4) CoA tarafından tiyoliz. Yağ açil zincirleri bu reaksiyonların sonucu iki karbon kısaltılır ve $FADH_2$, NADH ile asetil CoA teşekkül eder (Şekil 12.3). Yağ asitlerinin β-oksidasyonu yolu adı verilen bu reaksiyonlar serisi David Green, Severo Ochoa ve Feodor Lynen isimli biyokimyacıların çalışmaları ile aydınlatılmıştır. Şimdi bu reaksiyonları ayrıntılı olarak inceleyelim:



Şekil 12.4. Yağ asitleri oksidasyonundaki reaksiyon serisi; oksidasyon, hidrasyon, oksidasyon ve tiyoliz.

Yıkımın her devrinin ilk reaksiyonu açil CoA'nın bir açil CoA dehidrogenaz enzimi tarafından bir enoil CoA vermek üzere katalizlenen reaksiyondur. C-2 ile C-3 arasındaki çift bağ transdır.

$$\text{Açil CoA} + \text{E-FAD} \longrightarrow \text{trans-}\Delta^2\text{-Enoil CoA} + \text{E-FADH}_2$$

Açil CoA'nın dehidrojenasyonu TCA devrinde süksinatın dehidrojenasyonuna çok benzemektedir. Gerçekten β-oksidasyonun ilk üç reaksiyonu sitrik asit devrinin son basamaklarına benzemektedir.

Açil CoA ⟶ Enoil CoA ⟶ Hidroksiaçil CoA ⟶ Ketoaçil CoA
Süksinat ⟶ Fumarat ⟶ Malat ⟶ Okzalasetat

Daha sonraki reaksiyon, C-2 ve C-3 arasındaki çift bağın enoil CoA hidrataz enzimi katalizörlüğünde hidrasyonudur:

$$\text{trans-}\Delta^2\text{-Enoil CoA} + H_2O \rightleftharpoons \text{L-3-Hidroksiaçil CoA}$$

Enoil CoA'nın hidrasyonu da fumarat ve akonitat hidrasyonu gibi stereospesifik bir olaydır. Bu enzim tarafından trans-Δ^2 çift bağı hidrasyonu ile L-3-hidroksiaçil CoA, cis-Δ^2 çift bağı hidrasyonu ile de D-3-hidroksi açil CoA husule gelir.

Üçüncü reaksiyon ise, C-3 (β) hidroksil grubunun bir NADH açığa çıkarılmasıyla keto haline oksidasyonudur. Bu yükseltgenme reaksiyonu, hidroksiaçil substratın L-izomerine mutlak manada spesifik olan L-3-hidroksiaçil CoA dehidrogenaz enzimi tarafından katalizlenir.

$$\text{L-3-Hidroksiaçil CoA} + NAD^+ \rightleftharpoons \text{3-Ketoaçil CoA} + NADH + H^+$$

Son basamak 3-ketoaçil CoA'nın bir ikinci CoA molekülü tiyol grubu tarafından parçalanmasıdır. Bu tiyolitik parçalanma reaksiyonu β-ketotiyolaz enzimi tarafından katalizlenir ve ürün olarak bir molekül asetil CoA ve iki karbon kısaltılmış açil CoA meydana gelir. Böylece bir devir tamamlanmış olur. Kısaltılmış açil CoA tekrar açil

CoA dehidrogenaz tarafından katalizlenen reaksiyondan başlayarak bir başka oksidasyon devrine girer. Buradaki β-ketotiyolaz, hidroksiaçil CoA dehidrogenaz ve enoil CoA hidrataz enzimleri hemen hemen her uzunluktaki açil zincirleri için spesifiktir.

Şimdi bir yağ asidinin oksidasyonu sonucu enerji verimini hesaplayabiliriz. Herbir reaksiyon devrinde, yani iki karbon biriminin yağ asidinden asetil CoA olarak koparılmasıyla bir $FADH_2$ ile bir NADH teşekkül eder.

$$C_n\text{-Açil CoA}+FAD+NAD^+ + H_2O + CoA \longrightarrow C_{n-2}\text{-Açil CoA} + FADH_2 + NADH + H^+ + \text{Asetil CoA}$$

16 karbonlu doymuş bir yağ asidi olan palmitik asidin yıkımı 7 reaksiyon devriyle gerçekleşir. Yedinci devirde C_4-ketoaçil CoA iki molekül asetil CoA'ya parçalanır. Buradan palmitoil CoA'nın oksidasyon reaksiyonunun stokiyometrik denklemi şöyle yazılabilir:

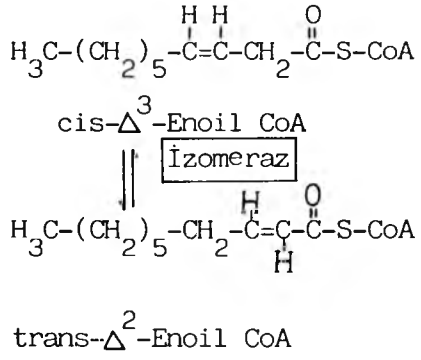
$$\text{Palmitoil CoA} + 7FAD + 7NAD^+ + 7CoA + 7H_2O \longrightarrow 8\ \text{Asetil CoA} + 7FADH_2 + 7NADH + 7H^+$$

Bir NADH molekülünün oksidatif fosforilasyonla 3 ATP, bir $FADH_2$'nin de 2ATP teşekkülüne sebep olduğu göz önüne alınır ve asetil CoA'nın sitrik asit devriyle 12 ATP verdiği hatırlanırsa, bir palmitoil CoA'nın tam oksidasyonu ile 21+14+96=131 ATP sentezlendiği görülür. Palmitatın aktifleştirilmesi esnasında ATP'nin AMP'ye ve 2 P_i'a parçalanmasıyla iki yüksek enerjili fosfat bağı harcanmaktadır. Böylece bir palmitat molekülünün tam oksidasyonu ile net olarak 129 molekül ATP teşekkül etmektedir.

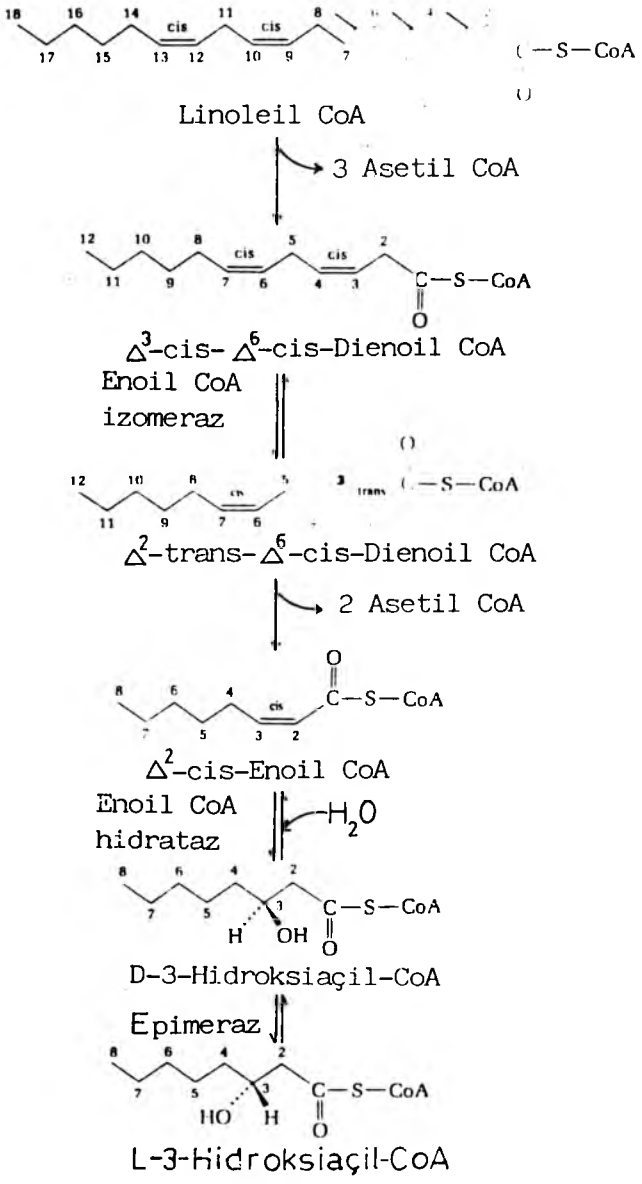
12.2.c. Doymamış Yağ Asitlerinin β-Oksidasyonu

Doymamış yağ asitlerinin oksidasyonu reaksiyonlarının birçoğu doymuş yağ asitlerinkiyle aynıdır. Farklı olarak bir izomeraz ve bir de epimeraz enzimleri rol almaktadır.

Şimdi C-9 ile C-10 karbon atomları arasında bir çift bağ ihtiva eden 16 karbon zincirli palmitoleik asidin oksidasyonunu inceleyelim. Bu yağ asidi aynen palmitik asit gibi aktifleştirilir ve iç mitokondri membranından matrikse geçirilir. Palmitoleil CoA başlangıçta doymuş yağ asitlerinin enzimleri ile üç reaksiyon devrine maruz kalır. Üçüncü devirde husule gelmiş olan cis-Δ^3-enoil CoA, açil CoA dehidrogenaz enziminin substratı değildir. C-3 ve C-4 atomları arasındaki çift bağ, C-2 ve C-3 arasında diğer bir çift bağ teşekkülüne mani olur. Bu engelleme bir izomeraz enziminin cis-Δ^3 çift bağını bir trans-Δ^2 çift bağına çevrilmesini katalizlemesiyle ortadan kaldırılır. Daha sonraki reaksiyonlar doymuş yağ asitlerinin oksidasyon yolunun enzimleri tarafından katalizlenir. Çünkü teşekkül etmiş olan trans-Δ^2-enoil CoA, krotonaz enziminin normal bir substratıdır. İzomeraz enziminin katalizlediği reaksiyonu şöyle özetleyebiliriz:



Linoleik asit gibi birden fazla cis çift bağ ihtiva eden yağ asitlerinin oksidasyonu ikinci bir yardımcı enzimi gerektirmektedir. Doymuş yağ asitlerindeki reaksiyonlarla üç asetil CoA, linoleil CoA'dan uzaklaştırıldığı zaman, aynen palmitoleil CoA'da olduğu gibi bir cis-Δ^3 çift bağı hasıl olur (Şekil 12.4). Bu da aynı şekilde izomeraz vasıtasıyla trans-Δ^2'ye dönüştürülür. Buradan itibaren yine doymuş yağ asitlerindeki reaksiyonlarla iki asetil CoA şeklinde 4 karbon daha zincirden koparılmış olur. Geride sekiz karbonlu cis-Δ^2 enoil CoA kalır. cis-Δ^2



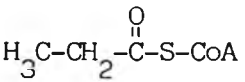
Şekil 12.4. Linoleik asidin oksidasyonu.

çift bağı enoil hidrataz tarafından hidratlanabildiğinden daha önceden izah edildiği gibi 3-hidroksi açil CoA' nın D-izomeri hasıl olur. Bu da NAD^+-bağlı dehidrogenaz enziminin substratı olmadığı için 3-hidroksi açil CoA epimeraz enzimi tarafından L-izomerine dönüştürülür. Bundan sonra yağ asidin tamamı doymuş yağ asitlerindeki gibi oksitlenir.

Linoleik ve palmitoleik asitlerde gördüğümüz gibi doymamış yağ asitlerinin oksidasyonunda çift bağlarda β-oksidasyon yolunun ilk FAD-bağlantılı yükseltgenme reaksiyonu vuku bulmamaktadır. Yani doymamış yağ asidindeki çift bağ adedince eksik $FADH_2$ hasıl olmaktadır. Bu tip yağ asitlerinin yıkımındaki ATP bilançosunu hesaplarken bu nokta dikkate alınmalıdır.

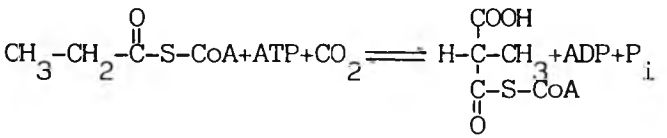
12.2.d. Tek Karbon Sayılı Yağ Asitlerinin Oksidasyonu

Canlı organizmalarda tek karbon sayılı yağ asitleri azınlıktadır. Bunların oksidasyonu çift karbon sayılı yağ asitlerinkiyle aynıdır. Yalnız yıkımın son devrinde asetil CoA yerine propiyonil CoA meydana gelmektedir.

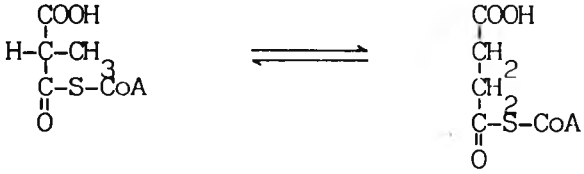


Propiyonil CoA

Propiyonil CoA'nın aktifleşmiş üç karbon birimi, propiyonil CoA karboksilaz ve metilmalonil CoA mutaz enzimlerinin katalizlediği iki reaksiyonla süksinil CoA'ya çevrilir ve sitrik asit devrine dahil olur.



Propiyonil CoA L-Metilmalonil CoA



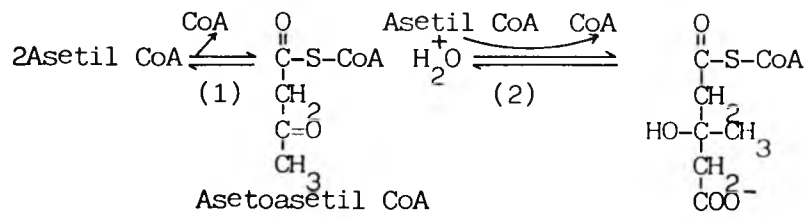
L-Metilmalonil CoA Süksinil CoA

Yukarıdaki ilk reaksiyonu katalizleyen propiyonil CoA karboksilaz enzimi koenzim olarak biyotin ihtiva eder. Metilmalonil CoA mutaz reaksiyonunda ise fevkalâde değişik kimyasal ve biyolojik özellikleri olan ve insanlar, hayvanlar ve muhtemelen bitkiler tarafından dışarıdan alınması gereken Vitamin B_{12} koenzim olarak kullanılmaktadır(bak.s.217).

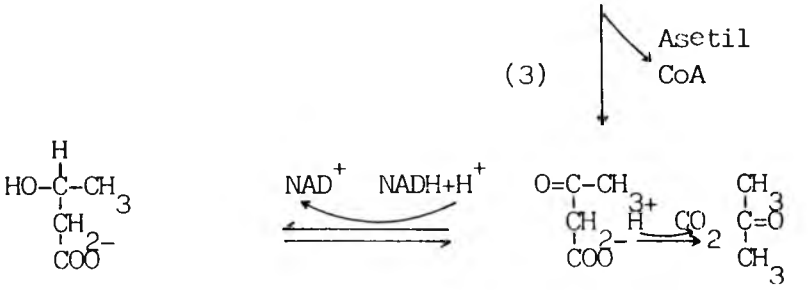
12.2.e. Keton Cisimleri

Yağ asitleri oksidasyonunda teşekkül eden asetil CoA'lar, eğer yağ ve karbohidrat yıkımları dengeli ise, sitrik asit devrine dahil olacaklardır. Metabolizmada sözü edilen "yağlar karbohidratların aleviyle yanar" deyişinin moleküler temeli bugün çok iyi bilinmektedir. Asetil CoA'nın TCA'ya girişi, sitrat teşekkülü için ortamda okzalasetatın mevcudiyetine bağlıdır. Eğer yağ yıkımı fazla ise, asetil CoA farklı bir akibete maruz kalır. Açlık ve şeker hastalığı durumunda okzalasetat glukoneogenez yolunda kullanılacağından asetil CoA ile birleşebilecek seviyenin altına düşer. Bu şartlar altında asetil CoA, asetoasetat ve D-3-hidroksibütirata dönüştürülür. İşte bu mekanizma ile teşekkül eden aseton, asetoasetat ve D-3-hidroksibütirat, keton cisimleri adını alır.

Asetoasetat asetil CoA'dan üç basamakta teşekkül eder:



Asetoasetil CoA 3-Hidroksi-3-metil glutaril CoA



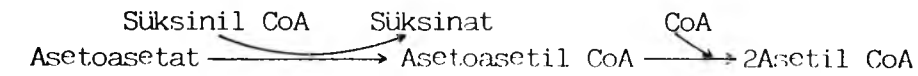
D-3-Hidroksibütirat Asetoasetat Aseton

Önce iki asetil CoA 3-ketotiyolaz (1) enzimi katalizörlüğünde birleşerek asetoasetil CoA oluşturur. Bu reaksiyon yağ asitleri oksidasyonun tiyolitik parçalanma basamağının dönüşümünden ibarettir. Daha sonra asetoasetil CoA, asetil CoA ile hidroksimetilglutaril CoA sentetaz(2) enzimi katalizörlüğünde 3-hidroksi 3-metil glutaril CoA'yı meydana getirir. Bu da daha sonra hidroksimetilglutaril CoA parçalayıcı enzim (3) vasıtasıyla asetil CoA ve asetoasetata ayrılır. D-3-Hidroksibütirat, D-3-hidroksibütirat dehidrogenaz (4) katalizörlüğünde asetoasetatın mitokondri matriksinde indirgenmesi sonucu teşekkül eder. Hidroksibütirat/asetoasetat oranı mitokondri içinde $NADH/NAD^+$ oranına bağlıdır. Asetoasetat yavaş ve kendiliğinden bir dekarboksilasyonla asetona çevrilir. Kanında yüksek asetoasetat seviyesi olan şahısların nefesleri aseton kokar.

Asetoasetat ve D-3-hidroksibütiratın üretildiği başlıca organ karaciğerdir. Daha sonra karaciğer mitokondrilerinden difüze olarak periferal dokulara kan dolaşımıyla taşınırlar. Son birkaç yıla kadar keton cisimleri fizyolojik önemi çok az olan bileşikler şeklinde addediliyordu. George Cahill ve diğer araştırmacılar bu bileşiklerin enerji metabolizmasında önemli rolleri olduğunu göstermişlerdir. Asetoasetat ve D-3-hidroksibütirat solunumun normal yakıt maddeleri olup, enerji kaynağı olarak önemli miktarda kullanılmaktadır. Gerçekten kalp kası ve

böbrek korteksi asetoasetatı glukoza tercih eder. Beyin dokusu ise, başlıca yakıt kaynağı olarak, dengeli beslenme durumunda glukoz kullanır. Bununla beraber açlık ve şeker hastalığında asetoasetattan faydalanacak şekle adapte olur. Uzun açlık döneminde beynin yakıt ihtiyacının % 75'i asetoasetat tarafından sağlanır.

Asetoasetat, spesifik bir CoA transferaz enzimi tarafından katalizlenen bir reaksiyonla, süksinil CoA'dan CoA transferi sonucu aktifleştirilir. Asetoasetil CoA daha sonra iki molekül asetil CoA vermek üzere parçalanır.



Asetil CoA'lar daha sonra sitrik asit devrine dahil olurlar. Karaciğer asetoasetatlarını başka organlara verir, çünkü spesifik CoA enzimi bulundurmaz.

Asetoasetat asetil CoA'nın suda çözünebilir ve taşınabilir bir şekli olarak değerlendirilebilir. Yağ asitleri adipoz doku tarafından salıverilir, karaciğer tarafından asetoasetata çevrilerek diğer dokulara ihraç edilir. Asetoasetatın düzenleyici bir rolü de vardır. Kandaki yüksek asetoasetat seviyesi asetil birimlerinin bolluğuna işarettir ve adipoz dokuda lipolizin azalmasına yol açar.

12.3. YAĞ ASİTLERİNİN SENTEZİ

Yağ asitlerinin sentezi aynen glikojen ve glukozda olduğu gibi, yıkımından farklı reaksiyonlarla gerçekleşir. Bu reaksiyon serisinin başlıca özellikleri şunlardır:

1. Yağ asitlerinin yıkımı mitokondri matriksinde cereyan ederken, biyosentezi sitozolde gerçekleşir.

2. Yağ asidi sentezinin ara bileşikleri bir taşıyıcı proteinin (ACP) sülfhidril gruplarına kovalent bağlıdır. Yıkımda ise CoA'ya takılıdır.

3. Yağ asidi biyosentezi enzimlerinin çoğu yağ asidi sentetaz kompleksi adı verilen bir multienzim sistemi şeklinde organize olmuşlardır. Yıkım enzimlerinde ise böyle bir husus söz konusu değildir.

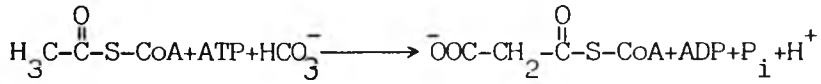
4. Yağ asidine karbon atomları ikili birimler halinde asetil CoA'dan sağlanır. Zincir uzaması basamağında iki karbon birimini veren aktifleşmiş bileşik malonil CoA'dır. CO_2'nin salınması ile uzama reaksiyonu ilerler.

5. Yağ asidi sentezinde indirgeyici olarak NADPH kullanılır.

6. Yağ asidi sentetaz kompleksinin uzatma reaksiyonu 16 karbonlu palmitat teşekkülüne kadar devam eder ve durur. Bundan sonraki uzamalar ve çift bağların oluşumu başka enzim sistemleri tarafından katalizlenir.

12.3.a. Doymuş Yağ Asitlerinin Sentezi

Yağ asitlerinin biyosentezinin aydınlatılması, Salih Wakil'in bikarbonatın kullanılma mekanizmasını ortaya koymasıyla gerçekleşti. Gerçekten yağ asitlerinin biyosentezi asetil CoA'nın malonil CoA'ya karboksilasyonu ile başlar. Prostetik grup olarak biyotin ihtiva eden asetil CoA karboksilaz enzimi tarafından katalizlenen bu reaksiyon dönüşümsüzdür.



Asetil CoA Malonil CoA

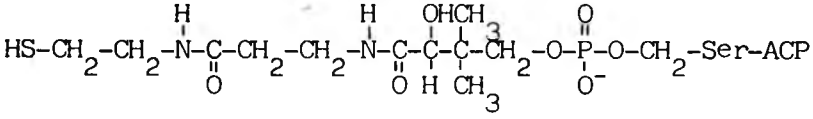
Biyotinin karboksil grubu, aynen piruvat karboksilaz enziminde olduğu gibi, lisin rezidüsünün ε-amino grubuna kovalent bağlıdır. İki enzim arasındaki bir başka benzerlik de asetil CoA'nın iki basamakta karboksile edilmesidir. Önce bir ATP harcanarak karboksibiyotin hasıl olmakta, sonra da CO_2 malonil CoA teşkil etmek üzere asetil CoA'ya aktarılmaktadır.

$$\text{Biyotin-enzim+ATP+}HCO_3^- \rightleftharpoons CO_2\sim\text{Biyotin-enzim+ADP+}P_i$$

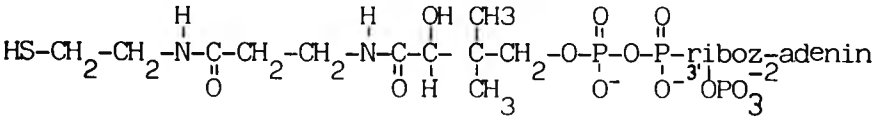
$$CO_2\sim\text{Biyotin-enzim+Asetil CoA} \longrightarrow \text{Malonil CoA+Biyotin-enzim}$$

Substratların bu enzime bağlanmaları ve ürünlerin salıverilmeleri spesifik bir sıra takip etmektedir. Böylece asetil CoA karboksilaz enzimi, bütün substratlar bağlanmadan önce bir veya daha fazla ürünün salıverildiği **ping-pong reaksiyon mekanizmasına** iyi bir örnek olmaktadır. Sitrat bu enzimin bir allosterik aktivatörü iken, son ürün palmitoil CoA da yağ asit sentezinin bu ilk dönüşümsüz reaksiyonunu inhibe etmektedir.

P.Roy Vagelos yağ asidi sentezi ara bileşiklerinin bir açil taşıyıcı proteine (ACP) bağlı olduğunu keşfetti. Bu protein de aynen CoA gibi bir fosfopantetein grubu ihtiva etmekte ve ara bileşikler bu grubun sülfhidril grubuna bağlanmaktadır. ACP'de adı geçen grup bir serin rezidüsüne kovalent takılmıştır. 77 amino asitten ibaret olan açil taşıyıcı protein bir makro CoA manzarasını vermektedir.



ACP'nin fosfopantetein prostetik grubu

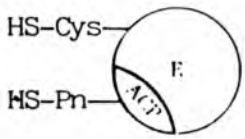


CoA'nın fosfopantetein grubu

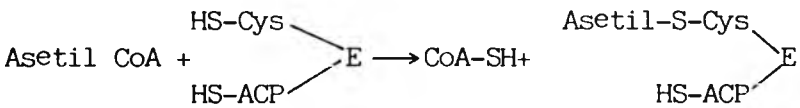
Doymuş uzun zincirli yağ asitlerini asetil CoA, malonil CoA ve NADPH'dan sentezleyen enzim sistemi yağ asidi sentetazdır. Yüksek organizmalarda bir multienzim kompleksi halindedir. Fakat bakteri yağ asidi sentetazları hücre parçalandığı zaman ayrışmaktadır. Bu ayrışan enzimlerin tek tek izole edilmesi, yağ asidi sentezi basa-

maklarının aydınlatılmasında çok faydalı olmuştur. Gerçekten yüksek organizmalarda yağ asidi sentezine yol açan reaksiyonlar bakterilerinkiyle çok büyük benzerlik arzetmektedir.

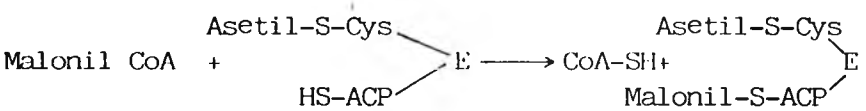
Yağ asitleri sentezinin uzama safhası asetil ve malonil gruplarının ACP'ye bağlanmasıyla başlar. Yağ asidi sentetaz iki esensiyal -SH grubuna sahiptir. Bunlardan birisi 4'-fosfopantetein prostetik grubuna (Pn) ait olup, diğeri spesifik sistein (Cys) kalıntısıdır. Her ikisi yağ asidi sentezine iştirak eder. Birinci -SH grubu malonil grubunun ikinci -SH grubu asetil grubunun giriş yeridir.



Asetil ve malonil gruplarının ACP'ye bağlanması iki enzimatik reaksiyonla gerçekleşir. Birinci reaksiyonda, ACP-asetiltransferaz vasıtasıyla asetil CoA'nın asetil grubu (tek karbon sayılı yağ asitlerinde propiyonil CoA'nın propiyonil grubu) yağ asidi sentetazın sistein -SH grubuna transfer edilir:

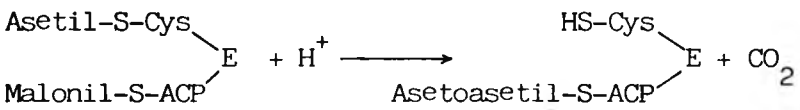


İkinci reaksiyonda ACP-maloniltransferaz vasıtasıyla malonil CoA'nın malonil grubu ACP'nin fosfopantetein sülfhidril grubuna transfer edilir. Malonil grubu sadece panteteinin -SH grubuna bağlanabilir.



Böylece iki açil grubu yağ asidi sentetaz üzerinde birbirine çok yaklaşmıştır ve zincir uzama prosesi için hazırdırlar.

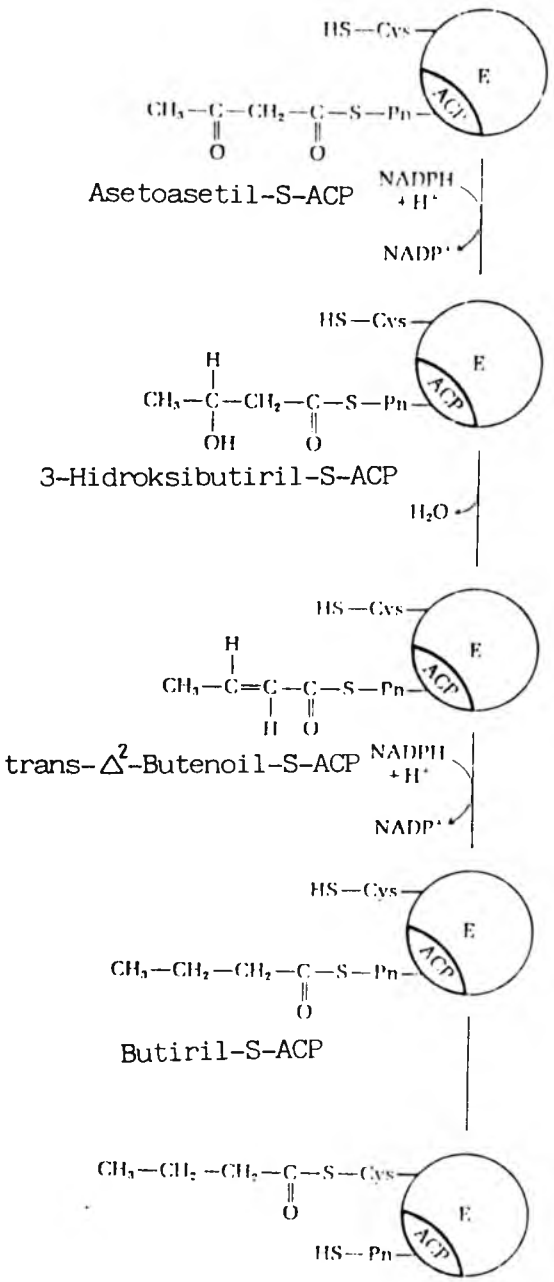
Daha sonra yağ asidi sentetazın -SH gruplarına kovalent bağlanan asetil ve malonil grupları, fosfopanteteinin -SH grubuna asetoasetil grubu oluşturacak şekilde kondanse olurlar. Bu reaksiyon 3-ketoaçil-ACP sentetaz tarafından katalizlenir:



Bu kondansasyon reaksiyonunun sonucu olarak iki ve üçer karbonlu birimlerden dört karbonlu bir birim oluşmaktadır. Acaba niçin bu sentez iki tane iki karbon birimlerinden meydana gelmemektedir. Bunun cevabı asetoasetil-ACP'nin iki asetil grubu bağlanmış E-ACP'den teşekkülünün termodinamik yönden mümkün olmamasının altında yatmaktadır. Bunun aksine asetil ve malonil gruplarının kondansasyonu sırasında dekarboksilasyon sonucu serbest enerjide bir azalma olmaktadır. Aslında bu reaksiyon doğrudan doğruya olmasa da, ATP hidrolizi ile yürümektedir. Çünkü asetil CoA'nın enerjice zengin malonil CoA'ya karboksilasyonunda ATP kullanılmakta ve bu serbest enerji dekarboksilasyonla açığa çıkmaktadır.

Yağ asidi sentezinde bundan sonraki üç basamakla C-3'teki keto grubu metilen grubuna indirgenir. Sentezin ilk devrindeki asetoasetil ACP oluşumundan itibaren olan reaksiyonlar Şekil 12.5'de verilmiştir.

Önce asetoasetil ACP, β-ketoaçil-ACP redüktaz katalizörlüğünde D-3-hidroksibütiril ACP'ye indirgenir. Bu reaksiyonun yıkım safhasındaki oksidasyonun dönüşümü olayından iki farkı vardır. Birincisi, L-yerine D-epimeri oluşmaktadır; ve ikinci olarak da oksidasyonda NAD^+ kullanılırken indirgeme NADPH tarafından gerçekleştirilmektedir. Böylece biyosentez olaylarında NADPH'ın indirgeyici gücünden faydalanılırken, enerji sağlayan reaksiyonlar sonucunda da NADH'ın oluştuğu genel prensibinin bir örneğini burada görmüş oluyoruz. İkinci reaksiyonla 3-hidroksiaçil-ACP dehidrataz beraberliğinde D-3-hidroksibutiril



Şekil 12.5. Yağ asidi sentezinin birbirini izleyen üç basamağı. Son reaksiyondan sonra butiril grubu Cys-SH grubuna transfer edilir. Şimdi Pn-SH grubu malonil CoA'dan malonil grubunu almaya hazırdır.

ACP'den bir H_2O çıkartılarak krotonil-ACP teşekkül etmektedir. Bu dehidrasyon olayı sonucu oluşan ara bileşik bir transΔ^2-enoil-ACP'dir. Devir sonunda kronotil-ACP enoil-ACP redüktaz katalizörlüğünde bir NADPH harcanması ile bütiril-ACP'ye indirgenmektedir. Oluşan butiril grubu Cys-SH grubuna transfer edilir.

Yağ asidi sentezinin ikinci devrinde bütiril grubu (C_4), yukarıdaki gibi malonil grubuyla kondanse olarak bir C_6-β-ketoaçil-ACP oluşturarak yeni bir devri başlatırlar. Bu uzama safhası C_{16}-açil-ACP teşekkül edinceye kadar devam eder. Daha sonra palmitat ve ACP-E vermek üzere hidrolizlenir.

Yağ asidi sentezinin bazı özelliklerini takdim etmeden önce reaksiyonlarını ve rol alan enzimlerini bir tablo halinde özetleyelim(Tablo 12.3).

Tablo 12.3. Yağ asidi sentezinin temel reaksiyonları.

Basamak	Reaksiyon	Enzim
1.	Asetil CoA+HCO_3^-+ATP ⟶ Malonil CoA+ADP+P_i+H^+	Asetil CoA karboksilaz
2.	Asetil CoA+ HS-Cys-E-HS-ACP → CoA-SH+ Asetil-S-Cys-E-HS-ACP	ACP-Asetil-transferaz
3.	Malonil CoA+ HS-ACP-E-Asetil-S-Cys → CoA-SH+ Malonil-S-ACP-E-Asetil-S-Cys	ACP-Malonil-transferaz
4.	Asetil-S-Cys-E-HS-Cys + Malonil-S-ACP + H^+ ⟶ E + CO_2 + Asetoasetil-S-ACP	3-Ketoaçil-ACP sentetaz (Birleştirme enzimi)
5.	Asetoasetil ACP-E+NADPH+H^+ ⇌ D-3-Hidroksibütiril-ACP-E+$NADP^+$	β-Ketoaçil-ACP redüktaz
6.	D-3-Hidroksibütiril-ACP-E ⇌ Krotonil-ACP-E+H_2O	3-Hidroksi-açil-ACP dehidrataz
7.	Krotonil-ACP +NADPH+H^+ ⇌ Bütiril-ACP +$NADP^+$	Enoil-ACP redüktaz

Bakterilerin aksine ökaryotik yağ asidi sentetazları multienzim kompleksi halindedirler. Meselâ maya enzim kompleksi 2300 kdal molekül ağırlığındadır. Elektron mikroskobunda 250 A° boyunda ve 210 A° eninde elips şekline sahip yapılar halinde görülen bu maya enzimi, herbiri tek gen tarafından şifrelenen iki çeşit polipeptid zincirinden ibarettir. A alt birimi (185 kdal) açil taşıyıcı proteini, 3-ketoaçil-ACP sentetaz ve β-ketoaçil-ACP-redüktazı ihtiva ederken, B alt birimi de (175 kdal) ACP-asetiltransferaz, ACP-maloniltransferaz 3-hidroksiaçil-ACP dehidrataz ve enoil-ACP redüktaz enzimlerini bulundurmaktadır. Memeli yağ asidi sentetazı (400 kdal) ise tıpkı maya hücreleri gibi iki alt birimden ibarettir. Gerçekten birçok ökaryotik multienzim kompleksleri, farklı enzimlerin tek bir polipeptid zincirinde kovalent bağlanmış çok fonksiyonlu proteinler ihtiva etmektedirler. Bu tarz düzenlenme ile farklı enzimlerin sentez fonksiyonlarının koordineli olarak yerine getirilmesi sağlanmaktadır. Bunun yanısıra kovalent bağlı enzimler, kovalent olmayan birleşmelere nazaran daha kararlı yapılar oluşturmaktadır.

Şimdi bir palmitat sentezinin stokiyometrisini inceleyelim:

$$\text{Asetil CoA} + 7\,\text{Malonil CoA} + 14\,\text{NADPH} + 7H^+ \longrightarrow \text{Palmitat} + 7CO_2 + 14\,\text{NADP}^+ + 8\,\text{CoA} + 6H_2O$$

Bu reaksiyonda kullanılan malonil CoA'nın teşekkül olayını

$$7\,\text{Asetil CoA} + 7CO_2 + 7\,\text{ATP} \longrightarrow 7\,\text{Malonil CoA} + 7\,\text{ADP} + 7P_i + 7H^+$$

ilâve ettiğimiz zaman palmitat sentezinin genel stokiyometrisi

$$8\,\text{Asetil CoA} + 7\,\text{ATP} + 14\,\text{NADPH} \longrightarrow \text{Palmitat} + 14\,\text{NADP}^+ + 8\,\text{CoA} + 6H_2O + 7\,\text{ADP} + 7P_i$$

şeklini alır. Buradan görüldüğü gibi, bir palmitat molekülünün sentezlenmesi için 8 molekül asetil CoA, 14 NADPH ve 7ATP lazımdır. Yağ asitleri sentezinin sitozolde, piruvattan asetil teşekkülünün mitokondride cereyan ettiği göz önüne alındığında, asetil CoA'ların mitokondriden sitozole transferi gerekmektedir. Bu transfer olayı sitrat tarafından gerçekleştirilmektedir. Önce asetil CoA ve okzalasettan kondansasyon ile mitokondri matriksinde sitrat teşekkül etmekte ve sitozole difüze olmaktadır. Burada sitrat, sitrat liyaz enzimi katalizörlüğünde

$$\text{Sitrat+ATP+CoA} \longrightarrow \text{Asetil CoA+ADP+P}_i\text{+Okzalasetat}$$

reaksiyonuyla parçalanmaktadır. Böylece asetil CoA ve okzalasetat mitokondriden sitozole bir ATP harcanmasıyla transfer edilmektedir. Asetil CoA transferi maksadıyla sitozole geçen okzalasetatın mitokondriye geri dönmesi gerekmektedir. İç mitokondri membranı okzalasetata geçirgen değildir. Geçiş için bir seri reaksiyon icabetmektedir:

Önce okzalasetat NADH ile malata indirgenir. Sitozoldaki malat dehidrogenaz tarafından sentezlenen bu reaksiyon şöyledir:

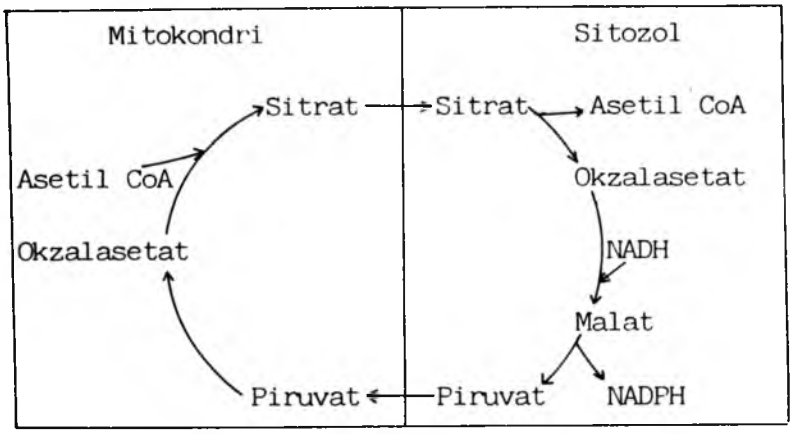
$$\text{Okzalasetat+NADH+H}^+ \rightleftharpoons \text{Malat+NAD}^+$$

Daha sonra daha önceden karşılaşmadığımız bir reaksiyon ve bir $NADP^+$-bağlı malat enzimi vasıtasıyla malat, oksidatif dekarboksilasyonla piruvata dönüştürülür:

$$\text{Malat+NADP}^+ \longrightarrow \text{Piruvat+CO}_2\text{+NADPH}$$

Burada oluşan piruvat kolayca mitokondriye geçer ve piruvat karboksilaz enzimi katalözürlüğünde tekrar okzalasetata çevrilir(Şekil 12.6).

$$\text{Piruvat+CO}_2\text{+ATP+H}_2\text{O} \longrightarrow \text{Okzalasetat+ADP+P}_i\text{+2H}^+$$



Şekil 12.6. Asetil CoA'nın mitokondriden sitozole taşınması.

Böylece mitokondriden sitozole geçen herbir asetil CoA başına bir NADPH üretilmektedir. Palmitat sentezinde 8 Asetil CoA kullanıldığı göz önüne alınırsa kullanılan 14 NADPH'ın 8'i bu mekanizma ile oluşturulmaktadır. Geride kalan 6 NADPH ise pentoz-fosfat yolundan sağlanmaktadır.

12.3.b. Doymamış ve Daha Uzun Zincirli Yağ Asitlerinin Sentezi

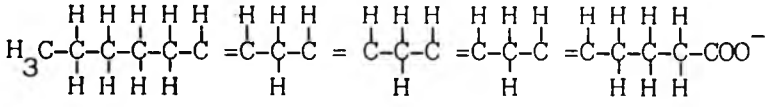
Yağ asidi sentezinin başlıca ürünü palmitattır. Ökaryotlarda daha uzun zincirli yağ asitleri, endoplazmik retikulum membranına bağlı enzim sistemleri (mikrozomal sistemler adı da verilir) tarafından katalizlenen uzama reaksiyonlarıyla teşekkül eder. Doymuş ve doymamış yağ asitlerinin karboksil uçlarına iki karbon birimlerinin ilâvesiyle bu sentez gerçekleştirilir. Mikrozomal sistemler aynı zamanda uzun zincirli yağ açil CoA'larda çift bağlar da teşkil ederler. Meselâ stearoil CoA da cis-Δ^9 çift bağı, bir moleküler oksijen ve NADH (veya NADPH) kullanılması sonucu bir oksidaz enzimi katalizörlüğünde oluşturulur:

$$\text{Stearoil CoA} + \text{NADH} + H^+ + O_2 \longrightarrow \text{Oleoil CoA} + NAD^+ + 2H_2O$$

Oleattan, birtakım uzama ve çift bağ oluşturma reaksiyonlarıyla muhtelif doymamış yağ asitleri meydana getirilebilir. Meselâ oleat 20:1 cis-Δ^{11} yağ asidine uzatılabilir. Aynı zamanda bir 18:2 cis$\Delta^{6,9}$ yağ asidi teşkil etmek üzere ikinci bir çift bağ moleküle sokulabilir. Benzer şekilde palmitat (16:0) palmitoleata (16:1, cisΔ^{9}) yükseltgenebilirken, cis-vaksenata (18:1, cisΔ^{11}) da uzatılabilmektedir. Memelilerde C-9'dan ötede çift bağ teşkil edecek enzimler yoktur. Bundan dolayı linoleat (18:2, cis$\Delta^{9,12}$) ve linolenat (18:3,cis $\Delta^{9,12,15}$) doymamış yağ asitlerini sentezleyemezler ve bunları diyetle almaları gerekir. Linoleat ve linolenat birçok diğer doymamış yağ asidinin memelilerde ön maddesidir. Aynı zamanda palmitoleat (16:1) ve oleat (18:1)'tan da bir takım doymamış yağ asitleri sentezlenir. Bundan dolayı doymamış yağ asitleri w-CH_3 grubu ile en yakın çift bağ arasındaki metilen karbonları sayısına göre dört gruba ayrılır:

1. Linolenat ailesi	$CH_3-(CH_2)_1-CH=CH-R$
2. Linoleat ailesi	$CH_3-(CH_2)_4-CH=CH-R$
3. Palmitoleat ailesi	$CH_3-(CH_2)_5-CH=CH-R$
4. Oleat ailesi	$CH_3-(CH_2)_7-CH=CH-R$

Meselâ araşidonat (20:4 cis $\Delta^{5,8,11,14}$) linoleat ailesindendir; yani sentezinde başlangıç bileşiği linoleik asittir. Aşağıdaki açık formülde görüldüğü gibi, molekülün uç bölümü linoleat ile aynıdır.



Yüksek bitkilerde linoleat ve linolenat, oleattan sentezlenir. Bu sentez, spesifik ve çok fonksiyonlu ve NADPH kullanılan oksigenaz enzimleri tarafından sağlanır.

12.3.c. Yağ Asidi Sentezinin Kontrol Mekanizması

Hücre içinde yağ asitleri seviyesi düşük, karbohid-

ratlar bol olduğu zaman yağ asidi sentezi en yüksek orandadır. Uzun dönem ve kısa dönem kontrol mekanizmaları ayrı ayrı önemlidir. Sitozolün sitrat konsantrasyonu yağ asit sentezinin en önemli kısa dönem düzenleyicisidir. Daha önceden belirtildiği gibi sitrat, yağ asidi sentezinin ilk ve dönüşümsüz reaksiyonunu katalizleyen asetil CoA karboksilaz enzimini aktifleştirmektedir. Hem asetil CoA, hem de ATP bol olduğu zaman sitrat seviyesi yüksektir. TCA devrindeki izositrat dehidrogenaz enziminin yüksek enerji yükü ile inhibe edildiğini hatırlarsak yüksek sitrat seviyesinin, yağ asidi sentezi için gerekli olan asetil CoA ve ATP'nin ortamda mevcut olduğunu gösterir. Palmitoil CoA'nın asetil CoA karboksilaz enzimi üzerine etkisi sitrata zıttır. Palmitoil CoA sitratın mitokondriden sitozole taşınmasını ve NADPH üreten glukoz 6-fosfat dehidrogenazı inhibe eder.

Uzun dönem kontrol ise, yağ asidi sentezinde görev alan enzimlerin sentez ve parçalanma hızlarındaki değişimlerle sağlanır. Bu tip düzenleme mekanizmasına adaptif kontrol adı verilir. Düşük yağ ve yüksek karbohidrat muhtevalı diyetle beslenen hayvanlarda, birkaç gün içinde karaciğer asetil CoA karboksilaz ve yağ asidi sentetaz enzimleri miktarında şaşırtıcı oranlarda artışlar gözlenmiştir.

12.4. KOLESTEROL METABOLİZMASI

Kolesterol, ökaryotik membranların yapısında bulunan ve membranın akışkanlık özelliğini düzenleyen bir bileşiktir. Aynı zamanda steroid hormonlarının, D-vitamininin ve safra asitlerinin türetildikleri başlangıç maddesidir.

Diyetle alınan kolesterol diğer lipidlerle beraber bağırsakta emilir ve şilomikronlarla VLDL'ye takılır. Emilen kolesterolün % 80-90'ı lenf sisteminde uzun zincirli yağ asitleri ile ester oluşturur. Ester teşekkülü bağırsak mukozasında da vuku bulabilir. Bitki sterolleri çok az miktarda emilirler.

Vücudun ihtiyacı olan kolesterolün büyük bir bölümü (1 gram/gün) vücut tarafından sentezlenirken, ortalama bir diyetle küçük bir bölümü (yaklaşık 0,3 gram/gün) dışarıdan alınır. Kolesterol tipik bir hayvan metabolizması ürünü olduğundan et, karaciğer, beyin ve yumurta sarısı gibi hayvan orijinli gıdalarda bol olarak bulunur.

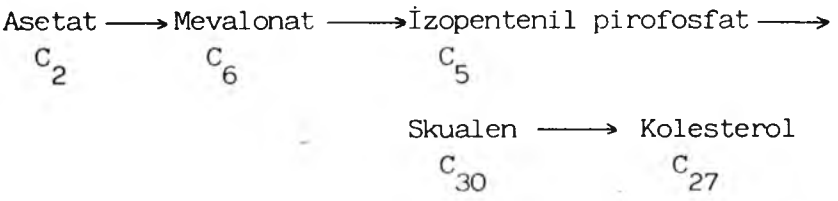
Vücuttan atılan kolesterolün yaklaşık yarısı safra asitleri, diğer yarısı da nötral steroidler halinde feçesle uzaklaştırılır. Yine kolesterolden sentezlenen steroid hormonları yıkım ürünlerinin idrarla atılan kısmı toplam kolesterolün yanında ihmal edilecek seviyededir.

12.4.a. Kolesterol Sentezi

Kolesterol senteziyle ilgili ilk ipucu 1940'larda Konrad Bloch'un çalışmalarıyla elde edildi. Önce karbon atomları izotopik olarak işaretlenmiş asetat farelere verilmiş ve bu asetatlarda kolesterol sentezlendiği müşahede edilmiştir. Gerçekten kolesterolün 27 karbonunun tamamı asetil CoA'dan gelmektedir. Daha sonra metil grubu ve ve karboksil grupları işaretlenen asetatların ayrı ayrı verilmesiyle, kolesterol karbonlarının hangilerinin metil grubundan, hangilerinin karboksil grubundan geldikleri tesbit edilmiştir. Bu buluşlar kolesterol sentezi yoluyla ilgili hipotezlerin denenmesinde çok yararlı olmuştur.

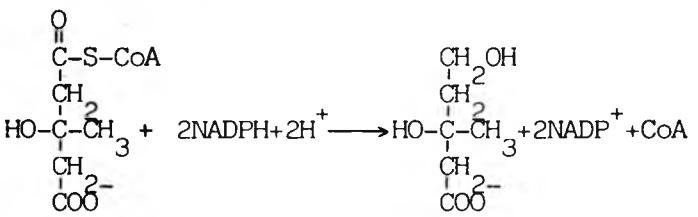
Kolesterol senteziyle ilgili ikinci önemli ipucu, ara bileşik olarak skualenin keşfiyle elde edilmiştir. Skualen daha önceden belirttiğimiz gibi, altı adet izopren biriminden ibaret bir bileşiktir. Buradan izoprenin asetattan nasıl oluştuğu suali gündeme gelmişti. Bunun cevabı umulmadık tarzda kolesterolle ilgili olmayan bir çalışmanın sonuçlarından elde edildi. Asetata ihtiyaç duyan bakteri mutantlarında mevalonatın, asetat yerine ikame edilebildiğinin gösterilmesi, kolesterol sentezinin aydınlatılmasında önemli bir dönüm noktası olmuştur. Gerçekten daha sonra yapılan çalışmalar, mevalonatın dekar-

boksilasyonla beş karbonlu izopren birimi verebildiğini, skualenin bu ön bileşikten türetilebildiğini ve kendisinin de asetattan sentezlendiğini göstermiştir. Bu araştırmaların sonucunda kolesterol sentezinin ana hatlarıyla;



yolunu takip ettiği ortaya koyulmuştur. Şimdi bu yolda cereyan eden kimyasal reaksiyonları enzimleriyle beraber inceleyelim.

Kolesterol sentezinde ilk safha asetil CoA'dan izopentenil pirofosfatın teşekkülüdür. Sentez reaksiyonları asetil CoA ve asetoasetil CoA'dan 3-hidroksi-3-metilglutaril CoA'nın oluşmasıyla başlar. Bu bileşiğin mitokondri matriksinde keton cisimlerinin teşekkülündeki rolünü daha önce görmüştük. Fakat kolesterol sentezinde kullanılan 3-hidroksi-3-metilglutaril CoA sitozolde oluşur ve burada mevalonata indirgenir:

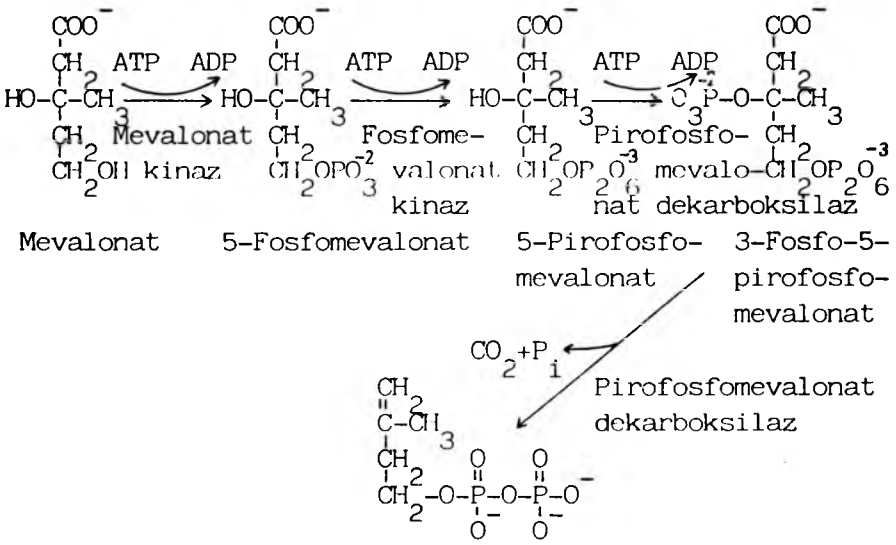


3-Hidroksi-3-metil-glutaril CoA

Mevalonat

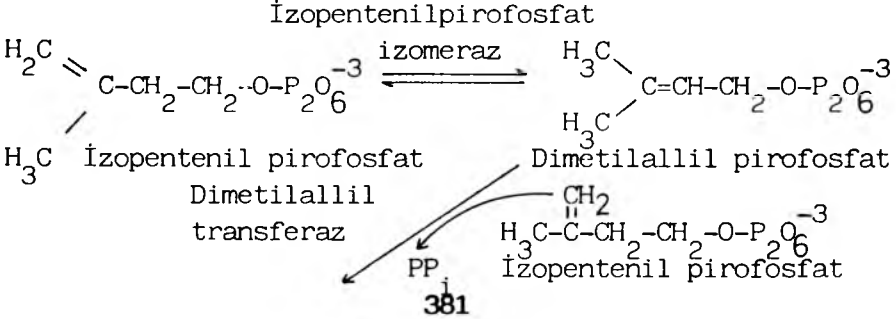
Yukarıdaki reaksiyon dönüşümsüz olup, 3-hidroksi-3-metilglutaril CoA redüktaz enzimi tarafından katalizlenir. Daha sonra mevalonat birbirini takip eden üç fosforilasyon reaksiyonuyla kararsız bir bileşik olan 3-fosfo-

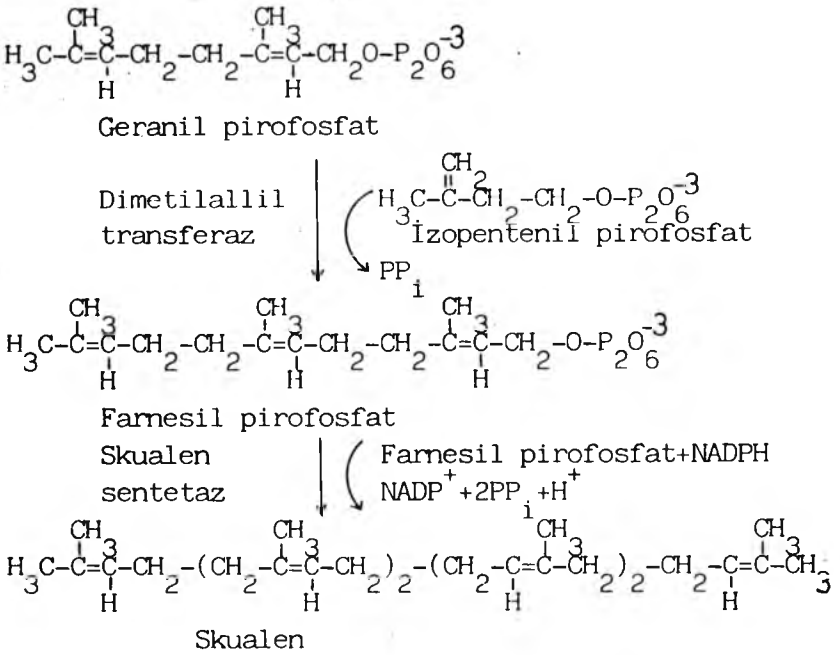
5-pirofosfomevalonata dönüştürülür. Bu da bir CO_2 ve P_i kaybederek 3-izopentenil pirofosfat bileşiğini oluşturur.



Kolesterol sentezinin ikinci safhasını izopentenil pirofosfattan skualenin türetilmesi teşkil eder. Bu da $C_5 \longrightarrow C_{10} \longrightarrow C_{15} \longrightarrow C_{30}$ reaksiyon sırasını takip eder.

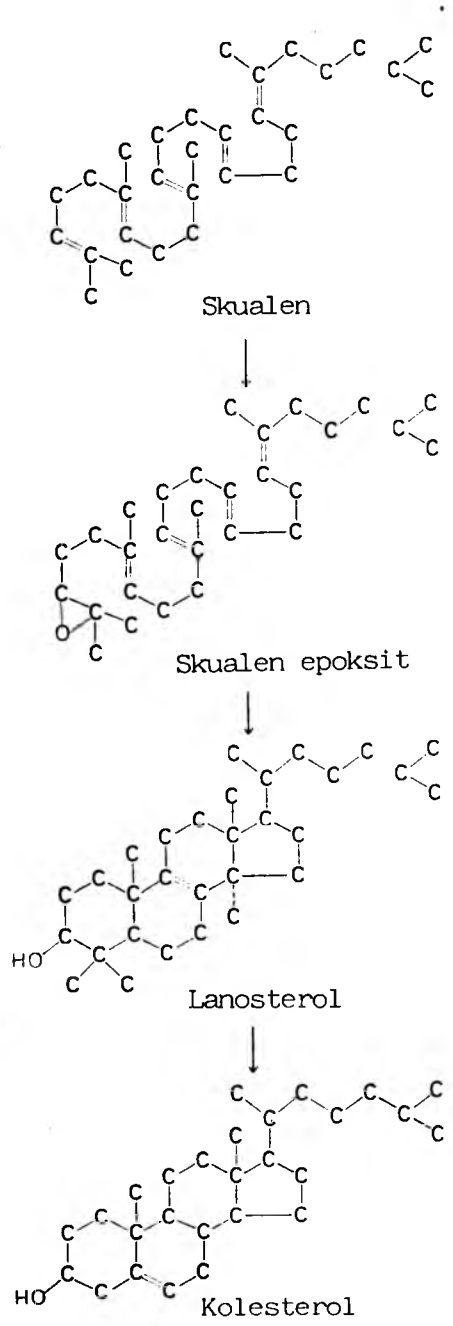
İkinci safhanın ilk reaksiyonu izopentenil pirofosfatın dimetilallil pirofosfata izomerizasyonudur. Daha sonra bu beş karbonlu bileşikle bir izopentenil pirofosfat kondanse olarak geranil pirofosfatı (C_{10}), bu da bir başka izopentenil pirofosfatla birleşerek 15 karbonlu farnesil pirofosfatı teşkil eder. Skualen sentezindeki son reaksiyon, iki farnesil pirofosfat molekülünün indirgenme beraberliğinde kondansasyonudur:





Kolesterol biyosentezinin son safhası skualenin siklik yapı kazanmasıyla başlar. Bu safhada O_2 ve NADPH'-ın kullanıldığı bir reaksiyonla skualen epoksit aktif ara bileşiği oluşur. Skualen epoksit bir siklaz enzimi katalizörlüğünde halkalı bir yapıya sahip lanosterole dönüştürülür. Son olarak da lanosterolden üç metil grubunun uzaklaştırılmasıyla, bir çift bağın NADPH ile indirgenmesi ve diğer bir çift bağın yer değiştirmesi ile kolesterol teşekkül eder(Şekil 12.7).

Memelilerde kolesterol başlıca karaciğerde sentezlenir. Bağırsaklarda da önemli miktarda kolesterol yapılır. Bu organlardaki kolesterol sentezinin hızı, diyetle alınan kolesterol miktarından çok kolay etkilenir. Bu feed-back kontrol mekanizması 3-hidroksi-3-metilglutaril CoA redüktaz aktivitesindeki değişikliklerle sağlanır. Önceden belirtildiği gibi bu enzim, mevalonat teşekkülünü dönüşümsüz olarak katalizlemekteydi. Diyetle alınan kolesterol karaciğerde redüktaz enzimi sentezini baskı altına alır ve mevcut olan diğer enzimlerin de substratsız kalarak inaktif olmasına yol açar.

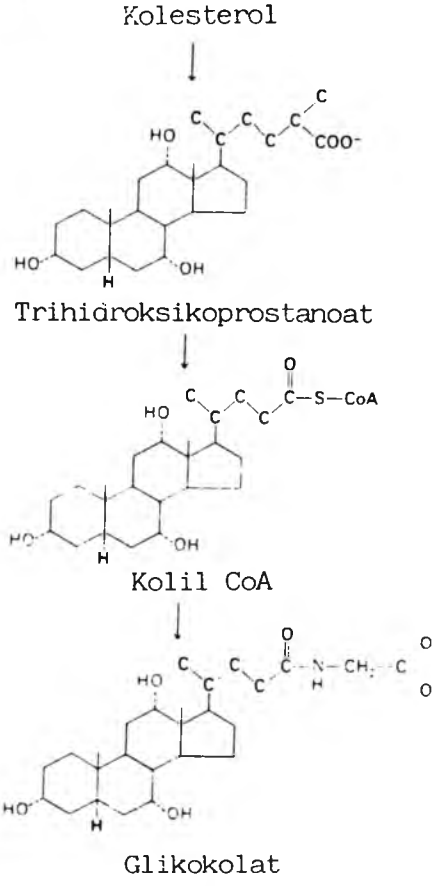


Şekil 12.7. Kolesterolün skualenden sentezi.

12.4.b. Safra Asitlerinin Sentezi

Safra asitleri kolesterolün polar türevleri olup, deterjan etkisi gösteren bileşiklerdir. Diyetle alınan yağları, kolay sindirimi için çözünmüş hale geçirir.

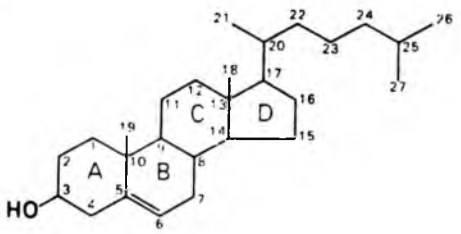
Safra asitleri sentezinde kolesterol, önce trihidroksikoprostanoata, daha sonra da birçok safra asidinin sentezlendiği kolil CoA aktifleşmiş ara bileşiğine çevrilir. Kolil CoA'nın aktif karboksil grubu daha sonra glisinin amino grubuyla reaksiyona girerek glikokolatı, taurinin ($H_2N-CH_2-CH_2-SO_3^-$) amino grubuyla reaksiyonuyla da taurokolatı oluşturur. En önemli safra asidi glikokolattır(Şekil 12.8).



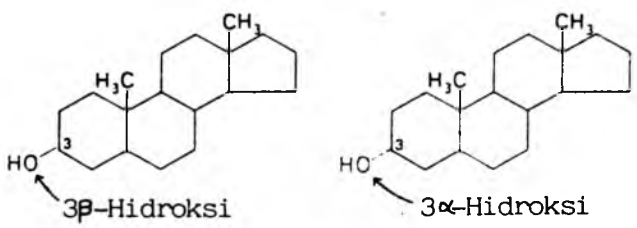
Şekil 12.8. Safra asitlerinin en sık bulunan tuzu olan glikokolatın sentezi.

12.4.c. Steroid Hormonlarının Sentezi

Steroid hormonları da memelilerde kolesterolden türetilen bileşiklerdendir. Daha önce lipidler bahsinde kısaca temas ettiğimiz steroid hormonlarının biyosentezine geçmeden önce, isimlendirilmeyle ilgili, biraz bilgi vermek isabetli olacaktır(bak. s. 173). Steroidlerdeki karbon atomlarının numaralandırılmalarını bir kolesterol molekülü üzerinde görelim:



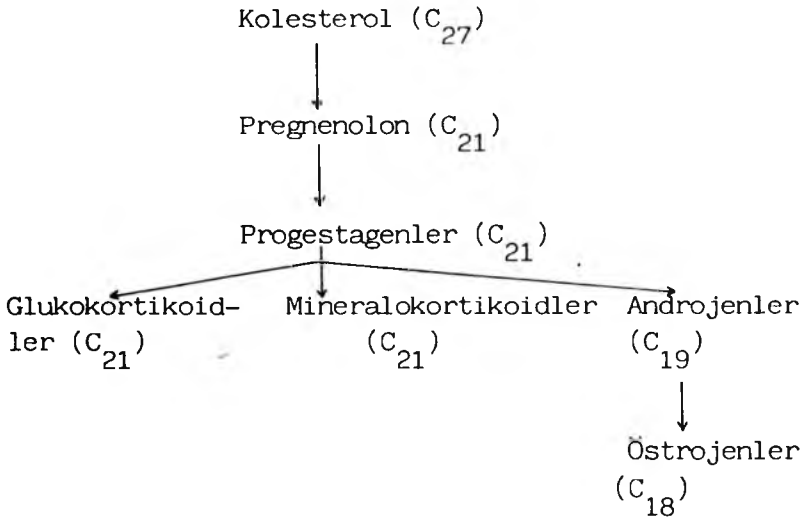
Steroidlerde başlıca A,B,C ve D olmak üzere 4 halka mevcuttur. Kolesterolde iki açısal metil grubu vardır: C-19 metil grubu C-10'a, C-18 metil grubu da C-13'e bağlıdır. C-10 ve C-13 üzerindeki çizgiler metil grubunu gösterir. Tarif olarak C-18 ve C-19 metil grupları kolesteroldeki halkalar düzleminin üzerinde yer almaktadır. Düzlemin üzerindeki herhangi bir sübstitüent β-düzeninde olup bir tam çizgi ile, altındaki sübstitüentler ise α-düzeninde olup bir kırık çizgi ile gösterilirler.



C-5 karbonuna bağlı hidrojen α-veya β-düzeninde olabilir. Bu hidrojen atomu α olursa A ve B halkaları bir trans konformasyonunda, β ise bir cis konformasyonunda birleşmişlerdir. C-5 hidrojeni gösterilmediği zaman kon-

formasyonu trans şeklindedir. C-5'te hidrojen ihtiva eden bütün steroid hormonlarında yapı ∝-düzenindedir. Safra asitlerinde ise bu konformasyon β-düzenindedir. Trans konformasyonunda düzlemsel bir yapı gözlenirken, cis de bükülmüş bir şekil alır.

Kolesterol beş sınıf önemli steroid hormonlarının ön bileşiğidir. Bu beş sınıf progestagenler, glukokortikoidler, mineralokortikoidler, androjenler ve östrojenlerdir. Bu hormonların biyosentetik yakınlıkları şöyle şematize edilebilir:



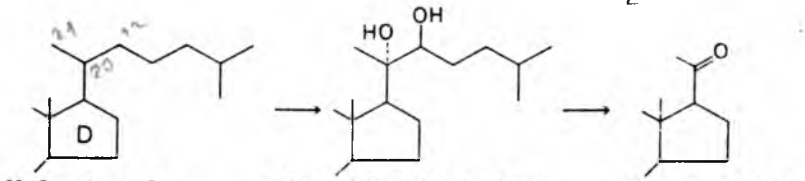
Kolesterolün skualenden sentezinde ve safra asitleriyle steroid hormonlarına çevrilmesinde, hidroksilasyon reaksiyonları önemli bir rol oynar. Bu hidroksilasyon reaksiyonlarının tamamı NADPH ve O_2 kullanan daha önceden anlattığımız (bak.s.315) monooksigenazlar tarafından katalizlenir.

Hidroksilasyon için O_2'nin aktifleştirilmesi gerekir. Steroid hormonlarının ve safra asitlerinin sentezinde bu aktifleştirme spesifik bir sitokrom olan P_{450} tarafından gerçekleştirilir. Bu sitokromun CO ile kompleksi 450 nm de maksimum absorbsiyona sahiptir. Sitokrom P_{450}'

adrenal mitokondrilerinde ve karaciğer mikrozomlarında bulunmuş olan elektron transport zincirlerinin uç bileşenini teşkil etmektedir. Bu elektron-transport zincirinin görevi, oksidatif fosforilasyondan ziyade hidroksilasyondur. Burada NADPH yüksek potansiyelli elektronlarını bir flavoproteine, o da hem grubu ihtiva etmeyen bir demir proteini olan adrenodoksine aktarır. Adrenodoksin okside sitokrom P_{450}'ye bir elektron verir. İndirgenmiş P_{450} de O_2'yi aktifleştirir.

Sitokrom P_{450} sistemi, yabancı bileşiklerin zehirleştirilmeleri olayında da önemli rol oynar. Meselâ bir barbitürat olan fenobarbital hidroksillenerek çözünürlüğü artar ve kolayca atılır. Aynı şekilde polisiklik aromatik hidrokarbonlar da P_{450} sistemi tarafından hidroksillenir. Bu bileşiklerin hidroksilasyonu glukoronat veya sülfatlar gibi çok polar bileşiklerin takılacağı bir bölge oluşturur ve bu sayede aromatik molekülün çözünürlüğü artar. Bununla beraber P_{450} sisteminin etkisi her zaman avantaj sağlamaz. Son yıllarda yapılan çalışmalar çok güçlü karsinojen bileşiklerin in vivo çok aktif hale çevrildiklerini göstermiştir. Bu metabolik aktifleştirme prosesi de umumiyetle P_{450} sistemi tarafından yürütülmektedir.

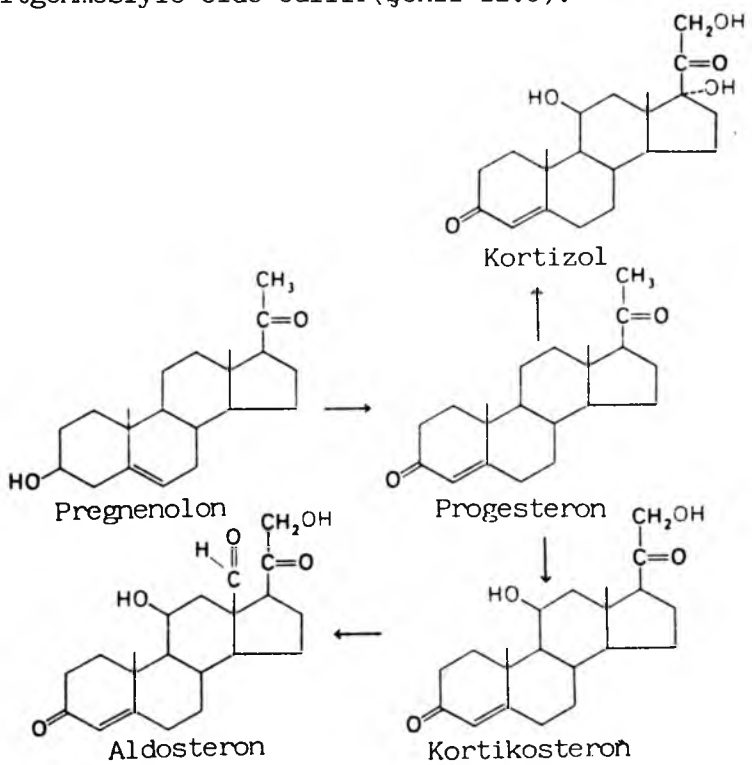
Kolesterolün 27 karbonuna karşılık steroid hormonları 21 veya daha az sayıda karbon ihtiva ederler. Steroid hormonları sentezinde ilk safha kolesterolün yan zincirinden bir C_6 biriminin uzaklaştırılması ve pregnenolonun teşekkülüdür. Yan zincir önce C-20 ve C-22 noktalarından hidroksillenir, C-20 ve C-22 arasındaki bağdan parçalanır. Parçalanma reaksiyonu desmolaz tarafından katalizlenir. Her üç reaksiyonda da NADPH ve O_2 kullanılır.



Kolesterol → 20∝, 22-Dihidroksi kolesterol → Pregnenolon

21 c'lu

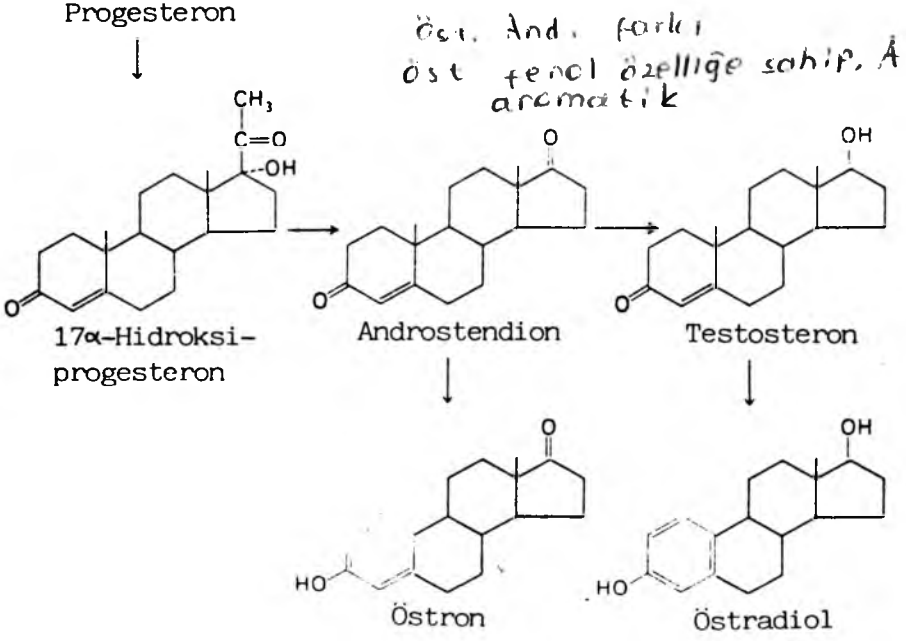
Bir progestagen olan progesteron, pregnenolondan iki basamakta sentezlenir. Pregnenolonun 3-hidroksi grubu, 3-keto grubuna oksitlenir ve Δ^5 çift bağı da Δ^4 çift bağına izomerize olur. En önemli glukokortikoid olan kortizol, progesteronun 17,21 ve 11 nolu karbonlarının hidroksillenmesiyle sentezlenir. C-17, C-21'den önce hidroksillenirken C-11 hidroksilasyonu her safhada gerçekleşebilir. Bu hidroksilasyon reaksiyonlarını katalizleyen enzimler son derece spesifiktir. En önemli mineralokortikoid olan aldosteron, progesteronun 21 ve 11 no'lu karbonunda hidroksilllenmesi ve C-18 metil grubunun aldehide yükseltgenmesiyle elde edilir(Şekil 12.9).



Şekil 12.9. Progesteron ve kortikoidlerin sentezi.

Androjenlerin sentezi progesteronunu C-17'den hidroksilasyonuyla başlar. Daha sonra C-20 ve C-21 yan zincirleri koparılarak androstendion androjen hormonu teşekkül eder. En önemli androjen olan testosteron androsten-

dionun 17-keto grubunun indirgenmesiyle ortaya çıkar. Androjenler 19 karbon atomu ihtiva ederler. Östrojenler C-19 metil grubunun koparılması ve aromatik bir A halkası oluşmasıyla androjenlerden sentezlenir. Bu reaksiyonlar NADPH ve O_2'ye ihtiyaç duyarlar(Şekil 12.10).



Şekil 12.10. Androjen ve östrojenlerin sentezi.

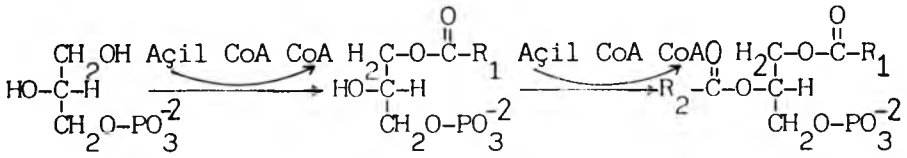
Kolesterolden türetilen bir diğer biyomolekül çeşidi, D vitaminleridir. Bu konu vitaminler bölümünde anlatıldığından (bak. s. 226) burada ele alınmayacaktır.

12.5. TRİAÇİLGLİSEROLLER, FOSFOLİPİDLER VE GLİKOLİPİDLERİN SENTEZİ

12.5.a. Triaçilgliserol ve Fosfogliseridlerin Sentezi

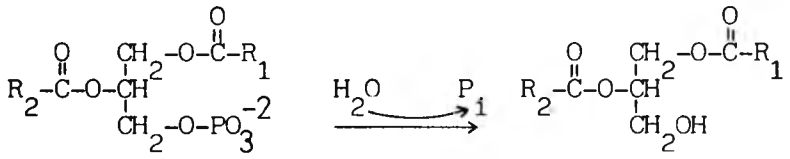
Fosfatidat (diaçilgliserol 3-fosfat) fosfogliseridlerin ve triaçilgliserollerin sentezinde ortak bir ara üründür. Başlangıç bileşiği olan gliserol 3-fosfat, başlıca dihidroksiaseton fosfatın indirgenmesiyle, az miktarda da gliserolün fosforillenmesiyle teşekkül eder. Gliserol 3-fosfat, açil CoA ile açillenerek lizofosfatidat teşekkül eder. Bunun da bir başka açil CoA ile açillenmesiyle fosfatidatlar meydana gelir. Bu açillenme re-

aksiyonları gliserol fosfat açil transferaz enzimleri tarafından katalizlenir.

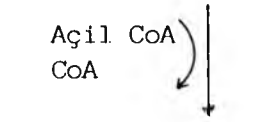


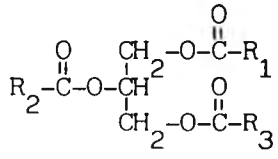
Gliserol-3-fosfat Lizofosfatidat Fosfatidat

Fosfogliseridlerin ve triaçilgliserollerin sentez yolları fosfatidatta birleşir. Triaçilgliserollerin sentezinde fosfatidat bir diaçilgliserol vermek üzere spesifik bir fosfataz enzimi tarafından hidrolizlenir.Bu digliserid, açil transferaz enziminin katalizlediği bir reaksiyonla bir triaçilgliserole açillenir. Bu enzimler membrana bağlı bulunan bir triaçilgliserol sentetaz kompleksinin bileşenleridir.



Fosfatidat Diaçilgliserol

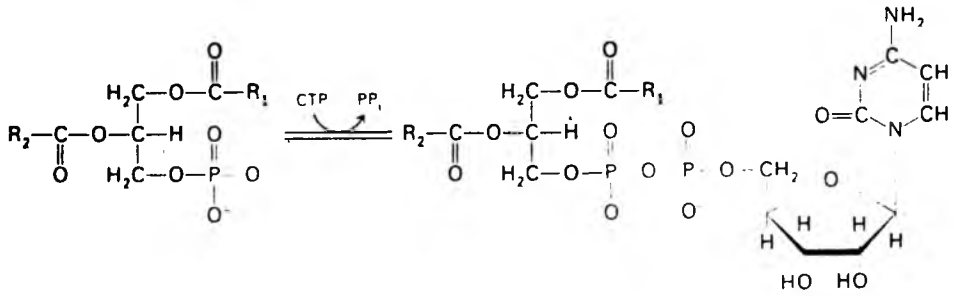




Triaçilgliserol

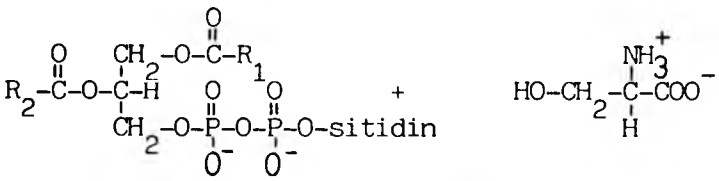
Fosfogliseridler muhtelif yollarla sentezlenirler. Bunlardan birisi fosfatidat ve sitidin trifosfat (CTP)'-

tan sitidin difosfodiaçilgliserol (CDP-diaçilgliserol) teşekkülüyle başlar. Bu reaksiyon dengesi pirofosfatın hidroliziyle ürünler lehine yürütülür.



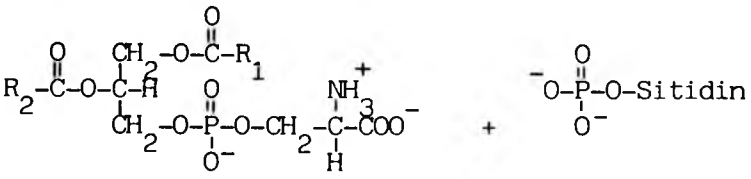
Fosfatidat CDP-diaçilgliserol

Daha sonra aktifleşmiş fosfatidil grubu polar bir alkolün hidroksil grubuyla reaksiyona girer. Eğer bu alkol serin ise, fosfatidil serin ve sitidinmonofosfat ürün olarak ortaya çıkar.



CDP-Diaçilgliserol Serin

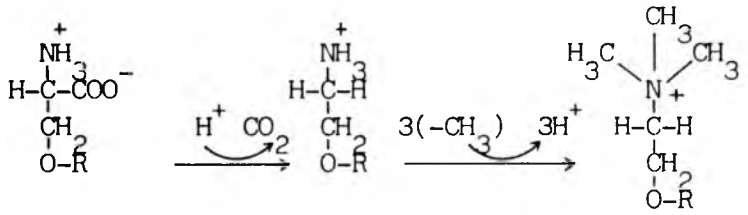
CDP-Diaçilgliserol-serin-O-fosfatidil transferaz



Fosfatidil serin CMP

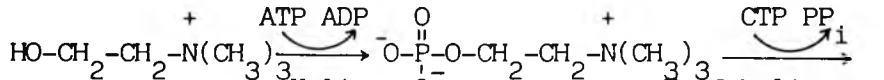
Burada sitidin nükleotidi, fosfogliseridlerin sentezinde üridin nükleotidinin glikojen sentezinde oynadığı rolü oynamaktadır. Her iki biyosentez olayında da fosforillenmiş bir substrattan (glukoz 1-fosfat veya fosfatidat) aktifleşmiş bir ara bileşik oluşmaktadır.

Fosfatidilserin koenzim olarak piridoksal fosfat ihtiva eden bir enzim tarafından dekarboksile edilerek fosfatidil etanolamine dönüştürülür. Daha sonra bu fosfogliseridin amino grubu üç defa metillenerek fosfatidil kolin oluşturulur. Burada sözü edilen metillendirmenin mekanizması amino asitlerin biyosentezinde etraflıca anlatılacaktır.

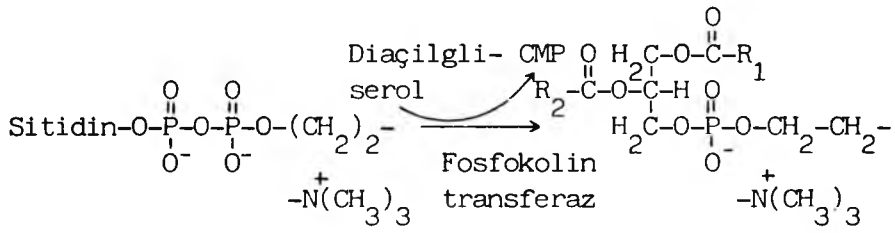


Fosfatidil serin — Fosfatidil etanolamin — Fosfatidil kolin

Fosfatidil kolin, kolinden başlayarak da sentezlenebilir. Önce kolin ATP tarafından fosforil koline çevrilir ve bu da CTP ile reaksiyona girerek CDP-kolini meydana getirir. Daha sonra CDP-kolinin fosforilkolin birimi bir diaçilgliserole aktarılarak fosfatidil kolin teşekkül eder.

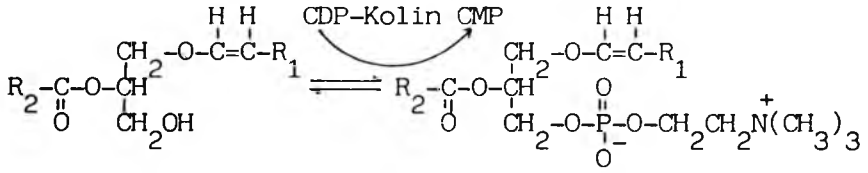


Kolin — Kolin kinaz — Fosforil kolin — Fosfokolin sitidil transferaz



CDP-Kolin | Fosfokolin transferaz | Fosfatidil kolin

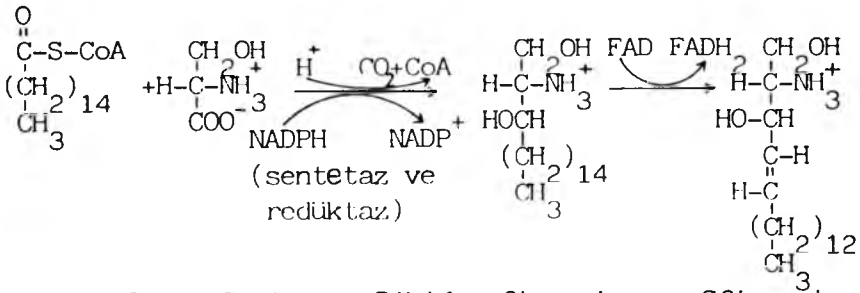
Bu yolda aktifleşmiş bileşik fosfatidat yerine fosforilkolindir. Fosfatidil etanolamin de benzer reaksiyonlarla etanolaminden sentezlenebilir. Plazmalojenler de aynı yolla yapılırlar. Bu bileşikler fosfogliseridlerden gliseroldeki 1 nolu karbon substitüentinin bir α, β doymamış eter olmasıyla ayrılır. Fosfatidal kolin (fosfatidil koline tekabül eden plazmalojen), fosforil kolin biriminin CDP-kolinden bir alkenil gliserol etere aktarılması sonucu sentezlenir.



Bir alkenil gliserol eteri | Fosfatidal kolin (bir plazmalojen)

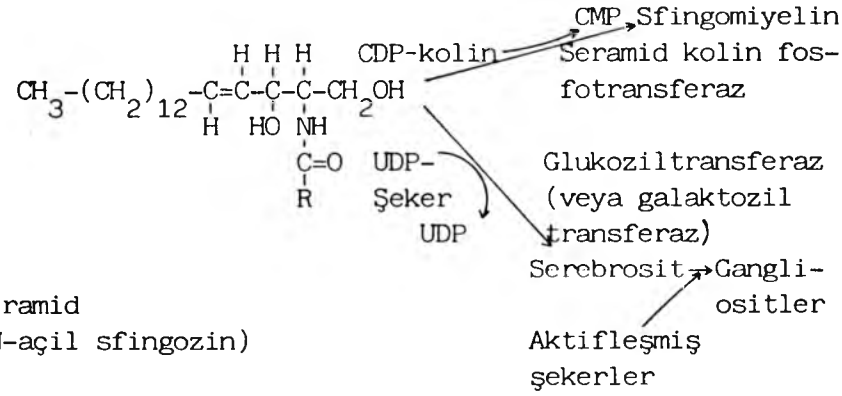
12.5.b. Sfingolipidler ve Glikolipidlerin Sentezi

Fosfolipidler sınıfında yer alan sfingolipidlerin omurgasını teşkil eden sfingozin, uzun zincirli bir alifatik amindir. Palmitoil CoA ve serinin kondensasyonu ile oluşan dihidrosfingozinin bir flavoprotein tarafından dehidrogenasyonu sonucu teşekkül eder.



Palmitoil CoA | Serin | Dihidrosfingozin | Sfingozin

Bütün sfingolipidlerde sfingozin amin grubu açillenmiştir. Uzun zincirli bir açil CoA sfingozinle sfingozin açil trensferaz katalizörlüğünde bir seramid teşkil etmek üzere reaksiyona girer. Sfingomiyelinde seramidin uç hidroksil grubu CDP-kolinden gelen fosforil koline fosfodiester bağı oluşturarak bağlanmıştır. Serebrositlerde ise bu hidroksile glikozid bağı ile glukoz veya galaktoz birimi takılmıştır. Burada şeker vericisi olarak UDP-glukoz veya UDP-galaktoz rol alır.



Gangliositler de bir serebroside glukoz veya galaktoz üzerinden bir oligosakkaritin bağlanmasıyla oluşur. Söz konusu oligosakkarit birimleri en az bir adet asidik şeker molekülü ihtiva ederler. Bu asidik şeker N-asetilnöraminat veya N-glikolilnöraminat olabilir ve bunlara sialik asitler adı da verilir. Bunların 9 karbonlu omurgaları fosfoenolpiruvat (bir C_3 birimi) ve N-asetilmannozamin (bir C_6 birimi)'den sentezlenir.

Gangliositler şeker birimlerinin sırayla seramide ilâvesi sonucu oluşturulur. UDP-Glukoz, UDP-galaktoz ve UDP-N-asetilgalaktozamin bu şeker rezidülerinin aktifleşmiş vericileridir. N-Asetil nöraminatın ise CMP türevi bu vazifeyi görür. Meydana gelen gangliositin yapısı hücredeki glikozil transferaz enzimlerinin spesifikliği tarafından tayin edilir. Bugün onbeşten fazla farklı gangliosit çeşiti bulunmuştur.

Gangliositler, sinir sisteminde özellikle gri maddede bol miktarda bulunur. Uç şekerlerinin sırayla koparılmasıyla devamlı yıkılmakta ve sentezlenmektedirler. Bu reaksiyonları katalizleyen glikozil hidrolazlar son derece spesifiktirler. Gangliosid yıkımı lizozomlarda vuku bulur. Bu organeller birkaç çeşit yıkım enzimlerini ihtiva ederler ve hücre bileşenlerinin düzenli yıkımları maksadına özelleşmişlerdir.

13. BÖLÜM: AMİNO ASİT METABOLİZMASI

Bu bölümde önce memeliler tarafından amino asit kaynağı olarak alınan proteinlerin sindirimi izah edildikten sonra, amino asitlerin yıkımı üre devri ile birlikte anlatılacaktır. Amino asitlerin sentezine geçmeden önce şimdiye kadar metabolizmasını incelediğimiz şeker ve yağların yapılarında ender rastlanan, ancak amino asitlerin önemli bir fonksiyonel bölümünü teşkil eden amino grubundaki azotun inorganik sistemden biyolojik sisteme geçiş hadisesi olan azot fiksasyonunu ele alacağız. Son olarak da amino asitlerin biyosentezini, amino asitlerden sentezlenen bazı bileşikleri ve yine azotlu bileşikler olan porfirinlerin yapımını izah edeceğiz.

13.1. PROTEİNLERİN SİNDİRİMİ

Proteinler katabolizma yollarına girmeden önce enzimatik reaksiyonlarla tamamen amino asitlere kadar hidrolizlenmelidir. Çünkü proteinler ve birçok peptidler, hücre membranlarını aşamazlar. Fakat amino asitler kolayca hücre içine absorblanabilirler.

Memelilerde proteinlerin hidrolizi midede başlar. pH'sı 1,0-1,5 arasında olan mide özsuyunda bulunan pepsin, gastrik mukozası hücrelerinden salgılanan bir enzim olup, aktif olmayan zimojen şeklinde (pepsinojen) bu hücrelerden salınır. Mide özsuyunda bulunan HCl mevcudiyetinde bir başka pepsin molekülü tarafından aktif hale çevrilir. Pepsin, proteinleri ihtiva ettikleri aromatik ve asidik yapıdaki amino asitlerinin peptid bağlarını amino uçlarından parçalar. Gastriksin adı verilen bir diğer mide proteolitik enzimi de izole edilmiştir.

pH'nın 7-8 arasında olduğu ince bağırsakta mideden gelen polipeptid zincirleri bir takım proteolitik enzimlerin etkisine maruz kalır. Bunlardan bazıları pankreas-

tan inaktif zimojenler halinde ince bağırsağa salınırlar. Tripsinojen, kimotripsinojen, prokarboksipeptidaz ve proelastaz adları verilen bu inaktif zimojenler ince bağırsakta aktif formlarına çevrilirler. pH 7,0'de maksimum aktivite gösteren tripsin, polipeptid zincirindeki arginin ve lisin rezidülerinin peptid bağlarını karboksil ucundan parçalar. Tripsin bir başka ifade ile bir endopeptidazdır, yani polipeptid zincirini uç peptid bağlarından değil, zincir içindeki peptid bağlarından parçalar.

Kimotropsin de bir endopeptidaz olup, başlıca aromatik amino asitlerin, çok az oranda da lösin ve metionin peptid bağlarını karboksil ucundan hidrolizler. Bir yerde, tripsin ve kimotripsin substrat spesifikliği yönünden birbirlerini tamamlarlar.

Prokarboksipeptidazlar sırayla karboksipeptidaz A ve B'ye aktifleştirilirler. Karboksipeptidazlar ekzopeptidazlar olup, yalnız uç peptid bağlarını hidrolizlerler. Karboksipeptidaz A, Zn^{+2} ihtiva eder ve COOH-uç peptid bağlarını lisin veya arginine veya prolinden bir önceki amino asidine kadar, karboksipeptidaz B ise, yalnız COOH-ucundaki lisin ve arginin rezidülerinin bağlı bulunduğu peptid bağını parçalar.

Tripsinin etkisiyle elastaza dönüştürülen proelastaz da pankreastan salgılanır. Elastaz nötral amino asitleri ihtiva eden peptid bağlarını parçalayabilirken, özellikle elastin üzerinde etkilidir.

İnce bağırsak mukozasından salgılanan amino peptidaz da bir ekzopeptidaz olup, zincirin NH_2-ucundaki peptid bağlarını hemen hemen hiçbir amino asit ayırdetmeksizin hidrolizler. Bağırsak mukozasında aynı zamanda dipeptid ve tripeptidleri parçalayabilecek dipeptidaz ve tripeptidaz enzimleri de salgılanır.

Mide, pankreas ve bağırsaktan salgılanan proteolitik enzimlerin kombine etkisi sonucu proteinler tamamen

amino asitlere hidrolizlenirler. Bağırsaktaki epitel hücreleri tarafından, enerji isteyen bir aktif transport prosesi ile absorblanırlar. Amino asitler daha sonra kan dolaşımı vasıtasıyla bütün dokulara taşınırlar. Doku hücrelerine tekrar bir aktif transportla dahil olan amino asitler, burada yıkıma uğrarlar.

Bazı dokularda, özellikle karaciğerde yüksek oranda vuku bulan hücre içi proteoliz olayının mekanizması hakkında çok az şey bilinmektedir.

Diyetle alınan proteinler, vücuttaki enerji ihtiyacının yaklaşık % 5'ini sağlarlar. Amino asitlerin vücutta ihtiyaç duyulan proteinlerin ve diğer biyomoleküllerin sentezinden artan kısmı atılamaz ve yağlar ve şekerler gibi depolanamaz. Vücutta mevcut olan proteinler de devamlı değişim içindedir. Değişimi yarılanma süresi cinsinden ifade edersek, kan, karaciğer ve diğer iç organları proteinlerinin 2,5 günle 10 gün arasında, toplam kas proteinlerinin 180 gün, kollagenin ise 1000 gün civarında yarılanma süresi vardır. Kas proteinlerinin miktarı çok olduğundan birim zamanda yıkılan ve sentezlenen protein miktarı karaciğerinkine eşittir.

13.2 AMİNO ASİTLERİN YIKIMI VE ÜRE DEVRİ

Amino asitlerin yıkımını incelerken, amino grubunun ve geride kalan karbon iskeletinin akibetlerini ayrı ayrı ele alacağız. Gerçekten, önce α-amino grubu transaminasyon ve oksidatif deaminasyon reaksiyonları ile uzaklaştırılıp çoğu üreye çevrilirken, karbon iskeletleri de asetil CoA, asetoasetil CoA, piruvat veya TCA devrinin ara bileşiklerinden birisine dönüştürülür. Yani amino asitlerin söz konusu olan iskeletleri ya CO_2 ve H_2O'ya kadar oksitlenerek organizmaya enerji sağlarlar veya yağ asitlerine, keton cisimlerine ve glukoza dönüştürülürler. Memelilerde amino asit yıkımının vuku bulduğu en önemli organ karaciğerdir.

13.2.a. ∝-Amino Grubunun Uzaklaştırılması

Birçok amino asidin ∝-amino grupları glutamat teşkil etmek üzere ∝-ketoglutarata aktarılır. Glutamat da daha sonra NH_4^+ vermek üzere oksidatif deaminasyona maruz kalır. Bir ∝-amino asitten bir ∝-keto aside ∝-amino grubunun transferini katalizleyen enzimlere transaminazlar veya aminotransferazlar adı verilir.

Transaminazların en önemlisi olan glutamat transaminaz bir amino grubunun ∝-ketoglutarata aktarılması reaksiyonunu katalizler:

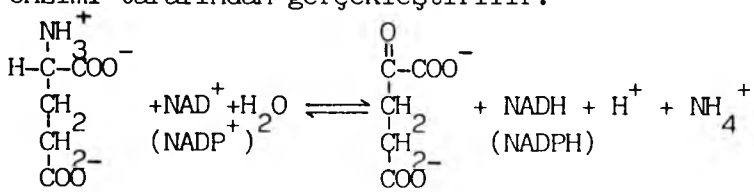
∝-Amino asit+ ∝-Ketoglutarat $\rightleftharpoons$ ∝-Keto asit+Glutamat

Memeli dokularında önemli olan bir başka transaminaz enzimi de,

∝-Amino asit+Piruvat $\rightleftharpoons$ ∝-Keto asit+Alanin

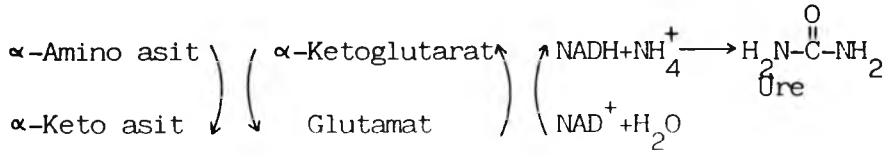
reaksiyonunu katalizleyen alanin transaminazdır. Burada teşekkül eden alanin de amino grubunu ∝-ketoglutarata transfer ederek glutamatı oluşturur. Bahsi geçen iki transaminazın reaksiyonları sonucu ∝-amino grupları, sonradan oksidatif deaminasyona uğrayacak olan glutamat moleküllerinde, bir başka tabirle bir "glutamat havuzunda" toplanmış olur.

Glutamatın oksidatif deaminasyonu, koenzim olarak hem NAD^+ hem de $NADP^+$ kullanan glutamat dehidrogenaz enzimi tarafından gerçekleştirilir.



Glutamat ∝-Ketoglutarat

Glutamat dehidrogenaz enziminin aktivitesi allosterik olarak düzenlenmektedir. Omurgalılardaki bu enzim altı özdeş alt birimden ibaret bir sistemdir. ATP ve GTP, enzimi allosterik olarak inhibe ederken, ADP ve GDP nükleotidleri de allosterik aktivatör rolü oynar. Yani hücre enerji yükündeki bir azalma amino asit oksidasyonunu hızlandırır. Karada yaşayan omurgalılarda NH_4^+ üreye çevrilir ve atılır. Bu reaksiyonların tümünü bir arada şematize edersek ∝-amino grubunun akibetini özetlemiş oluruz.



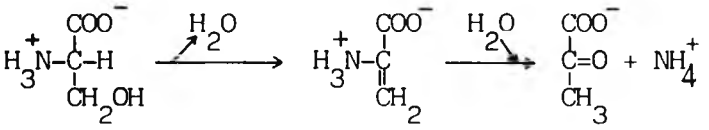
Bütün transaminaz enzimlerinde koenzim olarak piridoksinin (B_6 vitamini) bir türevi olan piridoksal fosfat görev yapar. Transaminasyon esnasında piridoksal fosfat, piridoksamin fosfat geçiş bileşiği oluşur(bak s. 208).

Serin ve treonin amino asitlerinin deaminasyonu farklı bir prosesle de doğrudan gerçekleştirilebilir. Bu özellikleri her ikisinin yan zincirlerinde bir hidroksil ihtiva etmelerinden kaynaklanmaktadır. Bu deaminasyon reaksiyonları yine piridoksal fosfat koenzimi taşıyan serin dehidrataz ve treonin dehidrataz enzimleri tarafından katalizlenir. Burada cereyan eden reaksiyonlar şöyledir:

Serin ⟶ Piruvat+NH_4^+

Treonin ⟶ ∝-Ketobütirat+NH_4^+

Bu enzimlere dehidrataz adı verilmesinin sebebi, deaminasyondan önce bir dehidratasyon olayının meydana gelmesidir. Meselâ serin önce ∝-karbonundan bir hidrojen, β-karbonundan da bir hidroksil kaybederek amino akrilata dönüşür. Bu kararsız bileşik daha sonra H_2O ile reaksiyona girerek piruvat ve NH_4^+'e parçalanır.

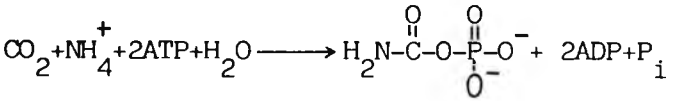


Serin Amino akrilat Piruvat

Üre devri: Amino asitlerin yıkımında oluşan NH_4^+'ün bir kısmı azotlu bileşiklerin biyosentezinde kullanılır. Karada yaşayan omurgalılarda artan NH_4^+ üreye çevrilerek atılır. Kuşlarda ve sürüngenlerde NH_4^+ ürik aside dönüştürülerek atılırken, deniz hayvanlarında NH_4^+ olduğu gibi itrah edilir. NH_4^+'ün atılış şekline göre organizmalar sırayla ürotelik, ürikotelik ve ammonotelik sınıflarına ayrılmaktadır.

Kara omurgalılarında üre, üre devri tarafından sentezlenmektedir. Bu reaksiyon, 1932 yılında, Hans Krebs ve Kurt Hanseleit tarafından sitrik asit devrinin aydınlatılmasından beş yıl önce keşfedilmiştir. Bir başka ifade ile üre devri siklik metabolik yollar arasında ilk bulunanıdır. Üre sentezindeki azotlardan birisi amonyaktan, diğeri ise aspartattan sağlanır. Karbon atomu da CO_2'den gelir. Üre, bir manada metabolizmanın artık maddeleri olan CO_2 ve amonyağın beraberce atılma şeklidir. Ornitin amino asidi üredeki karbon ve azot atomlarının taşıyıcısı rolünü oynar.

Üre devrinin ilk reaksiyonu, CO_2 ve glutamatın oksidatif deaminasyonu ile açığa çıkan NH_4^+'ün reaksiyonudur. 2 molekül ATP'nin tüketildiği bu dönüşümsüz reaksiyonla yüksek enerjili bir bileşik olan karbamoil fosfat oluşur.

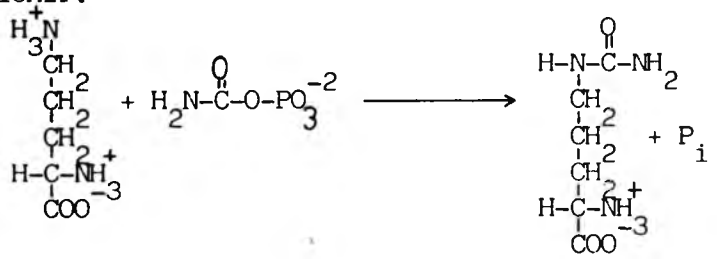


Karbamoil fosfat

Karbamoil fosfat sentetaz enziminin katalizlediği

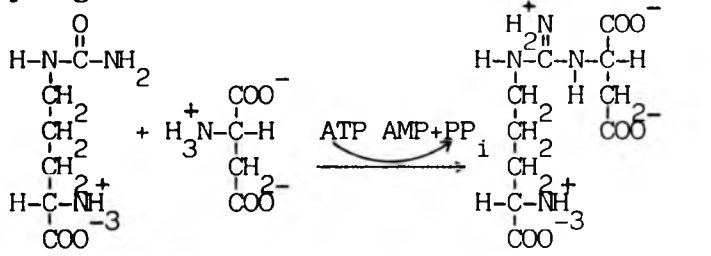
bu kompleks reaksiyonda allosterik aktivatör olarak da N-asetil glutamat rol alır.

Yukarıda teşekkül eden karbamoil fosfat, karbamoil grubunu ornitine aktararak sitrulini oluşturur ve fosfat grubu da serbest hale geçer. Aşağıda gösterilen bu reaksiyon, ornitin transkarbamoilaz enzimi tarafından katalizlenir.



Ornitin Karbamoil fosfat Sitrulin

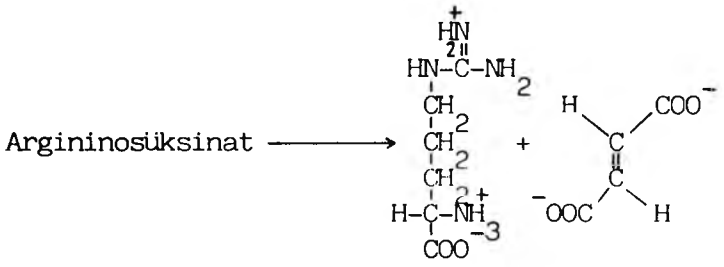
Üçüncü reaksiyonla, üre devrinin ikinci amino grubu aspartattan devreye sokulur. Aspartatın amino grubu da ileride göreceğimiz gibi bir başka glutamattan sağlanmaktadır. Görüldüğü gibi, ürenin iki azotu da netice itibariyle glutamat havuzundan temin edilmektedir.



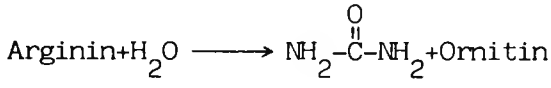
Sitrulin Aspartat Argininosüksinat

Bu kondansasyon reaksiyonu argininonsüksinat sentetaz enzimi tarafından katalizlenir ve enerji dengesi bir ATP'nin ve ondan oluşan pirfosfatın hidrolizi ile ürünler lehine çevrilir.

Dördüncü reaksiyon, üçüncü basamak ürününün argininosüksinaz tarafından arginin ve fumarata parçalanmasıdır. Burada aspartatın karbon iskeletini muhafaza ettiği, yalnız amino grubunu verdiği görülmektedir.

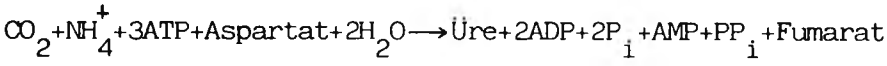


Burada oluşan fumarat, trikarboksilik asit devrine gider. Bu noktaya kadar vuku bulan reaksiyonlar birçok canlılarda arginin sentezinde kullanılmaktadır. Ürotelik hayvanlarda arginini, ornitin ve üreye parçalayan arginaz enzimi vardır.



Böylece ornitin bir başka karbamoil fosfatla reaksiyona girmek üzere tekrar ortaya çıkmıştır.

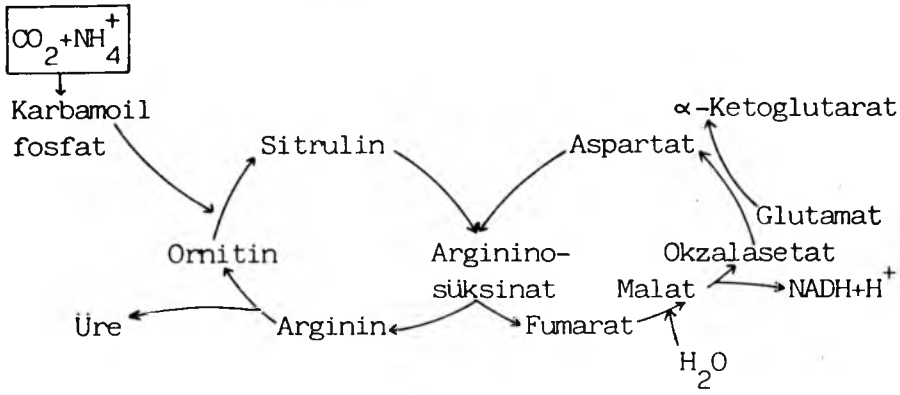
Üre sentezinin stokiyometrik denklemi şöyle özetlenebilir:



Pirofosfatın da hemen hidrolizlendiği göz önüne alınırsa, bir molekül ürenin sentezi için dört adet yüksek enerjili fosfat bağının harcandığı görülür. Üre devrinde oluşan fumarat vasıtasıyla üre devri ve TCA devri birbirine bağlanır. Fumarat önce malata hidratize olur ve müteakiben okzalasetata yükseltgenir. Okzalasetatın daha önceden gördüklerimizle beraber üç akibeti vardır: (1) Aminasyonla aspartata dönüşebilir, (2) Glukoneogenezle

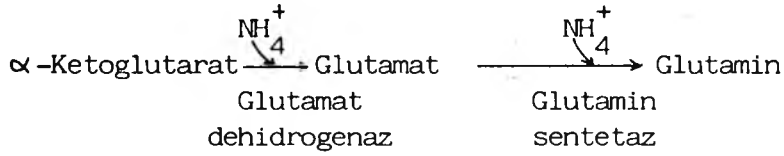
glukoza çevrilebilir, (3) Asetil CoA ile kondanse olarak sitrat oluşturabilir.

Şimdi üre devrini ve bu devrin sitrik asit siklüsüyle bağlantısını aşağıdaki şema ile özetleyelim:



Üre devri reaksiyonlarının bir bölümü karaciğer hücrelerinin mitokondri matriksinde, bir bölümü de sitozolünde cereyan eder? NH_4^+'ün glutamat dehidrogenaz enzimi vasıtasıyla teşekkülü, karbamoil fosfatın ve daha sonra ornitinle birleşerek sitrulinin meydana gelişi mitokondri matriksinde, üre devrinin geri kalan üç reaksiyonu da sitozolde vuku bulur.

İnsanlarda yüksek NH_4^+ seviyeleri toksik etkiye haizdir. Karaciğerdeki üre sentezi NH_4^+'ün uzaklaştırılması için en önemli yoldur. Üre devrinin herhangi bir basamağının bloke olması hayatı tehlike arzeder. Çünkü bu durumda kanda NH_4^+ seviyesi artar (hiperammonemi). Bunun sonucu olarak da, glutamat dehidrogenaz enzimi reaksiyonunun dengesi glutamat yönüne kayar ve α-ketoglutarat miktarı azalır. Oluşan glutamat da bir başka NH_4^+ ile reaksiyona girerek glutamini oluşturur:



Bir sitrik asit devri ara bileşiği olan ∝-ketoglutaratın azalması, ATP sentezi hızını düşürür. Beyin ise ATP seviyesindeki azalmalara karşı son derece hassastır.

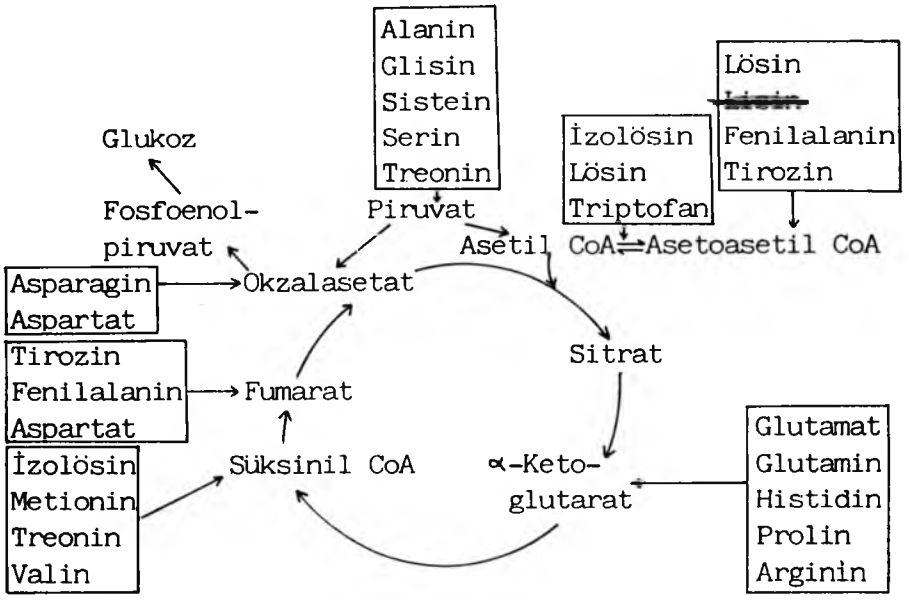
13.2.b. Amino Asitlerin Karbon İskeletlerinin Yıkımı

∝-Amino grubu uzaklaştırılmış olan amino asitlerin geride kalan karbon iskeletleri, glukoza çevrilebilen veya sitrik asit devri tarafından yükseltgenebilen ara bileşiklere dönüştürülür. Gerçekten yirmi amino asidin karbon iskeletleri yedi çeşit moleküle çevrilir: piruvat, asetil CoA, asetoasetil CoA, ∝-ketoglutarat, süksinil CoA, fumarat ve okzalasetat (Şekil 13.1). Burada metabolik dönüşümlerin ne kadar ekonomik yürüdüğüne bir örnek daha görüyoruz.

Asetil CoA veya asetoasetil CoA'ya yıkılan amino asitlere ketogenik amino asitler adıverilir; çünkü keton cisimlerinin artışına sebep olurlar. Piruvat, ∝-ketoglutarat, süksinil CoA, fumarat veya okzalasetata çevrilen amino asitlere de glukogenik amino asitler denir. Çünkü bu TCA devri ara bileşikleri ve piruvat, fosfoenolpiruvata ve daha sonra da glukoza dönüştürülebilir. Memelilerde asetil CoA veya asetoasetil CoA'dan glukoz sentezi yolları kapalıdır.

Yirmi amino asitten yalnız lösin ve lisin tamamen ketogeniktir. İzolösin, ~~lisin,~~ fenilalanin, triptofan ve tirozin hem ketogenik, hem de glukogeniktir. Geride kalan 14 amino asit tamamen glukogeniktir.

Daha önceden alanin ve serinin nasıl piruvata dönüştüğünü görmüştük. Glisin ise, bir hidroksimetil grubunun enzimatik katılmasıyla önce serine çevrilir ve daha sonra piruvatı meydana getirir. Sistein, benzeri yollarla kükürt atomunu H_2S, SO_3^{-2} veya SCN^- şeklinde vererek piruvata dönüşür. Treoninden de aminoaseton üzerinden piruvat meydana gelir.



Şekil 13.1. Amino asitlerin karbon iskeletlerinin yıkımı.

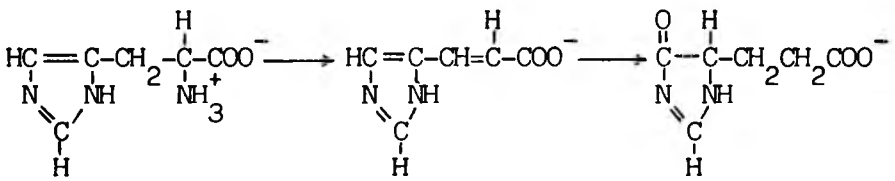
Asparagin ise, önce asparaginaz enzimi vasıtasıyla aspartat ve NH_4^+'a parçalanır. Aspartat da transaminasyonla bir sitrik asit devri ara bileşiği olan okzalasetata çevrilir:

$$\text{Aspartat} + \alpha\text{-Ketoglutarat} \rightleftharpoons \text{Okzalasetat} + \text{Glutamat}$$

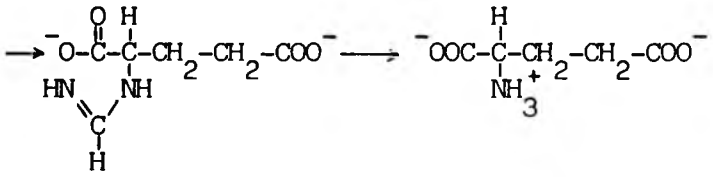
Üre devrinden hatırlayacağımız gibi, aspartat üre devriyle fumarata da dönüştürülebilir.

Glutamin, prolin, arginin ve histidin farklı reaksiyonlarla önce glutamata, oradan da oksidatif deaminasyonla ∝-ketoglutarata çevrilir.

Histidin önce aşağıda gösterildiği gibi, urokonat üzerinden 4-imidazolon-5-propiyonata dönüşür. Bu ara bileşiğin halkasındaki amid bağı hidrolizlenerek glutamatın N-formimino türevi oluşur. Formimino grubunun aktifleşmiş bir karbonlu birim taşıyıcısı olan tetrahidrofolata transferi ile glutamat teşekkül eder.

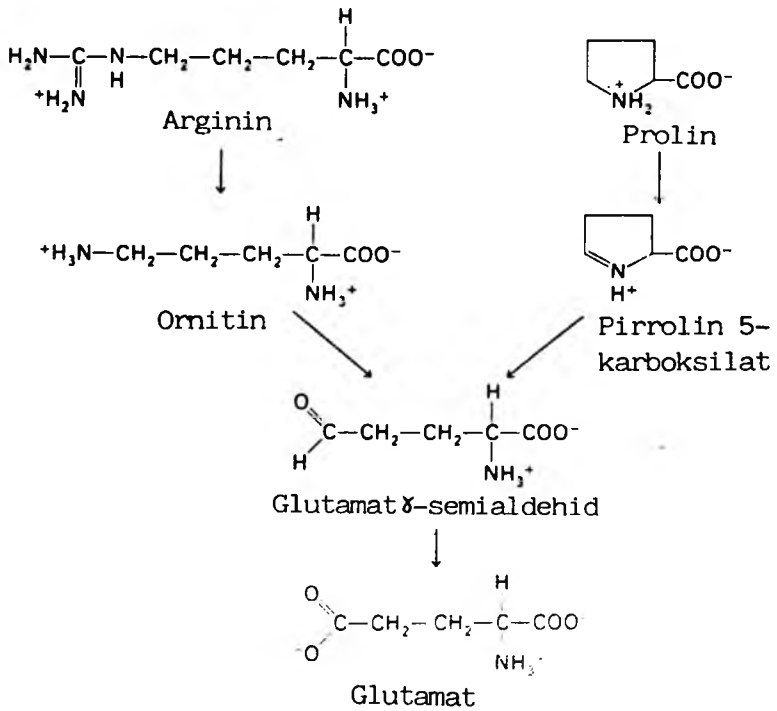


Histidin Urokonat 4-İmidazolon-5-propiyonat



N-Formiminoglutamat Glutamat

Glutamin, glutaminaz enzimi yardımıyla glutamat ve NH_4^+'e hidrolizlenir. Prolin ve arginin ise, önce glutamat γ-semialdehide, oradan da oksidasyonla glutamata dönüşür.



Arginin Prolin Ornitin Pirrolin 5-karboksilat Glutamat γ-semialdehid Glutamat

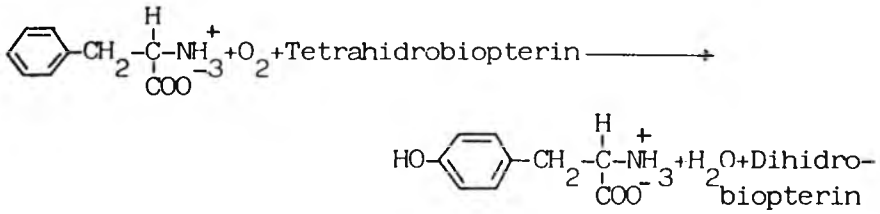
Metiyonin, izolösin, valin ve treonin de süksinil CoA'ya çevrilerek sitrik asit devrine girerler. Bunlardan

metiyonin, izolösin ve treonin önce propiyonil CoA'ya, valin ise metil malonil CoA'ya çevrilerek oradan süksinil CoA'ya dönüştürülürler. Bu reaksiyonlar daha önceden tek karbon sayılı yağ asitlerinin son ürünü olan propiyonil CoA'nın maruz kaldığı reaksiyonların aynıdır ve propiyonil CoA karboksilaz, izomeraz ve metilmalonil CoA mutaz enzimlerinin katalizörlüğüyle gerçekleşmektedir.

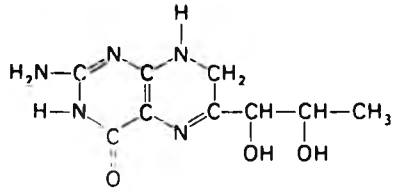
Lösinin tamamen ketogenik özellikteki tek amino asit olduğunu daha önceden görmüştük. Bu amino asidin asetoasetil CoA ve asetil CoA'ya çevrilmesi, birbirini takip eden altı reaksiyonla gerçekleştirilir. Bu reaksiyonlar önceden gördüğümüz yağ asidi yıkımı ve sitrik asit devri reaksiyonlarıyla çok benzemektedir. Tiamin pirofosfat (TPP), lipoat, FAD, piridoksal fosfat ve biyotin bu reaksiyonları katalizleyen enzimlerde koenzim olarak görev yaparlar.

Valin ve izolösin de ikinci bir yol olarak lösine benzer bir yolla yıkılırlar. Önce transaminasyonla bir ∝-ketoaside, ∝-ketoasit de dekarboksilasyonla bir CoA türevine çevrilir. Bundan sonraki reaksiyonlar yağ asidi oksidasyonuyla aynıdır. Bu oksidasyon sonucu izolösin, asetil CoA'ya ve propiyonil CoA'ya, valin ise metil malonil CoA'ya dönüştürülür.

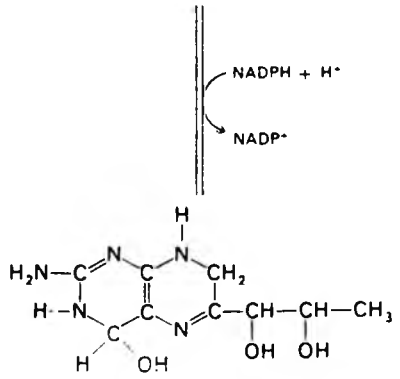
Fenilalanin ve tirozinin yıkımında bazı ilgi çekici hususlar vardır. Bu reaksiyonlarda moleküler oksijen aromatik halkanın parçalanmasında kullanılmaktadır. İlk basamakta fenilalanin, bir monooksigenaz olan fenilalanin hidroksilaz enzimi tarafından hidroksillenerek tirozine çevrilmektedir.



Burada indirgeyici olarak tetrahidrobiopterin görev yapmaktadır. Yükseltgenmiş şekli dihidrobiopterindir.



Dihidrobiopterin



Tetrahidrobiopterin

Tirozin daha sonra transaminasyonla p-hidroksifenil piruvata dönüştürülür. Buradaki halka arka arkaya iki dioksigenaz enzimi katalizörlüğünde parçalanarak, sonunda tirozinin karbon iskeleti bir fumarat ve bir asetat moleküllerine ayrışır.

13.3. AMİNO ASİTLER, TÜREVLERİ VE PORFİRİNLERİN SENTEZİ

Bu kısımda amino asitlerin ve bunlardan türetilen bazı moleküllerin biyosentezini inceleyeceğiz. Önce azotun amino asitlere akımını ele alacağız. Bu olay N_2'nin, azot tesbit edici mikroorganizmalar vasıtasıyla NH_4^+'e indirgenmesiyle başlar. NH_4^+, daha sonra glutamat ve glutamin aracılığı ile amino asitlere sokulur. 20 amino asitten 10 tanesi sitrik asit devri ve diğer önde gelen metabolik ara bileşiklerinden oldukça basit reaksiyonlarla sentezlenir. Gerçekten insanların geride kalan 10 amino asidi diyetlerinde almaları gerekir ve bu yüzden de bu amino asitlere esensiyal veya ekzojen amino asitler adı verilir.

13.3.a. Azot Fiksasyonu (Azotun Tesbit Edilmesi)

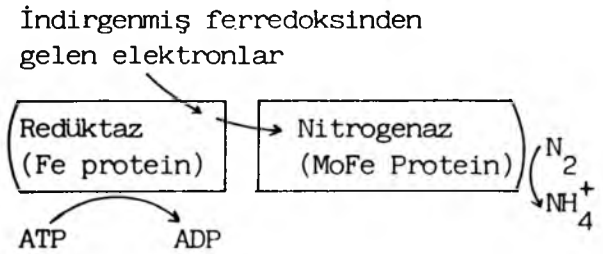
Amino asitlerin, pürinlerin, pirimidinlerin ve diğer biyomoleküllerin azot atomları NH_4^+ iyonundan gelmektedir. Yüksek canlılarda N_2'yi organik bileşiklere sokacak mekanizma yoktur. Bu dönüşüm azot fiksasyonu adı verilen bir olayla, bakteriler ve mavi-yeşil algler tarafından yürütülmektedir. Rhizobium bakterileri adı verilen bu gruptan bir mikroorganizma türü baklagillerin köklerini işgal ederek nodüller teşkil eder ve burada da azot fiksasyonu gerçekleşir. Mikroorganizmalar tarafından bir yılda yaklaşık $2x10^8$ ton N_2'nin tesbit edildiği tahmin edilmektedir. 225 kcal/mol'lük bir bağ enerjisine sahip olan N≡N bağı kimyasal reaksiyonlara karşı oldukça direnç gösterir. Bu yüzden Lavosier tarafından "cansız" manasında "azot" adı verilmiştir. Endüstriyel yoldan azot fiksasyonu 1910 yılında Fritz Haber tarafından gerçekleştirilmiş ve bugün bile gübre fabrikalarında kullanılmaktadır.

$$N_2 + 3H_2 \rightleftharpoons 2NH_3$$

denklemi ile gösterilen bu reaksiyon demir katalizörlüğünde 500 °C ve 300 atm. basınç altında yürütülmektedir.

Mikroorganizmalarda azot fiksasyonu, nitrogenaz kompleksi adı verilen karmaşık bir enzim tarafından gerçekleştirilir. Bu enzim iki çeşit protein bileşeninden ibarettir: Birisi yüksek indirgeyici güce sahip olan elektronları sağlayan redüktaz, diğeri de bu elektronları N_2 molekülünü NH_4^+'a indirgemede kullanan nitrogenaz. Her iki protein de bir demir-kükürt proteini olup, demir bir sistein ve bir de inorganik kükürde bağlanmıştır. Nitrogenaz bileşeni ilâveten bir veya iki tane de molibden atomu ihtiva eder ve bu yüzden MoFe proteini olarak da isimlendirilir. $\alpha_2\beta_2$ şeklinde bir alt birim yapısında olup, molekül ağırlığı 200 kdal civarındadır. Birbirinin aynı iki polipeptid zincirinden ibaret olan redüktazın molekül ağırlığı ise 65 kdal'dur.

Nitrogenaz enzim kompleksi tarafından N_2'nin NH_4^+'e çevrilmesi için ATP ve güçlü bir indirgeyiciye ihtiyaç vardır. Birçok azot tesbit edici mikroorganizmalarda, bahsi geçen bu altı elektronluk indirgenme olayında yüksek potansiyelli elektron kaynağı olarak indirgenmiş ferredoksin görev yapmaktadır. Ferredoksinin fotosentez olayında da çok önemli bir rolü olduğunu daha önceden belirtmiştik. Bu elektron taşıyıcı protein bazı mikroorganizmalarda fotosentetik, bazılarında ise oksidatif yolla indirgenmektedir. Nitrogenaz kompleksi reaksiyonunu hem şematik hem de stokiyometrik olarak şöyle gösterebiliriz:



$$N_2 + 6e^- + 12ATP + 12H_2O \longrightarrow 2NH_4^+ + 12ADP + 12P_i + 4H^+$$

Nitrogenaz enzim kompleksi üzerinde yapılan son çalışmalar bu reaksiyonun aşağıdaki basamaklar sonucu gerçekleştiğini ortaya koymuştur: Önce indirgenmiş ferredoksin elektronlarını kompleksin redüktaz bileşenine aktarır. Daha sonra ATP bu proteine bağlanarak konformasyonunu değiştirir ve redoks potansiyelini de -0,29 V'dan -0,40 V'a kaydırır. Redüktazın daha da artan indirgeme gücü sayesinde elektronlar nitrogenaz bileşenine transfer edilecek hale gelir. Üçüncü basamakta da ATP hidrolizlenir, elektronlar aktarılır ve redüktaz bileşeni nitrogenazdan ayrılır. Son olarak nitrogenaz bileşenine bağlı olan N_2,NH_4^+'e indirgenir.

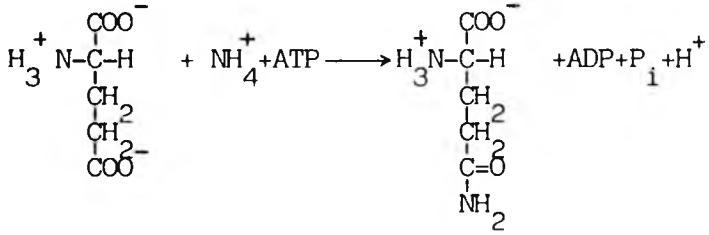
Haber prosesi ile gübre üretiminde çok fazla enerji tüketilmektedir. Enerji kaynaklarının azalması, araştırmacıları azotlu gübrelerin üretiminde azot tesbit edici mikroorganizmalardan faydalanmağa yöneltmiştir.

Azotun biyomoleküllere dahil edilmesindeki ilk adım NH_4^+ iyonunun amino asitlere girişiyle atılır. Glutamat ve glutamin bu olayda aracıdır. Birçok amino asidin α-amino grubu transaminasyonla glutamattan gelir. Glutaminin yan zincirinde bulunan amino grubu ise, çok çeşitli ve aynı zamanda önemli bileşiklerin biyosentezinde görev alır.

Glutamat, NH_4^+ ve α-ketoglutarattan, glutamat dehidrogenaz enzimi katalizörlüğü ile sentezlenir. Bu enzimi daha önce oksidatif deaminasyon reaksiyonunda görmüştük. Glutamat biyosentezi bu reaksiyonun dönüşümü olup, koenzim olarak NADPH kullanır.

$$NH_4^+ + \alpha\text{-Ketoglutarat} + NADPH + H^+ \rightleftharpoons L\text{-Glutamat} + NADP^+ + H_2O$$

Amonyum iyonu ile glutamatın reaksiyonu sonucu da glutamin oluşur. Glutamin sentetaz tarafından katalizlenen bu reaksiyon bir ATP'nin hidrolizlenmesiyle yürütülür:



Glutamat Glutamin

Glutamin sentetazın düzenlenmesi azot metabolizmasının en önemli kontrol noktasıdır. Bu enzimle glutamat dehidrogenaz bütün canlılarda bulunur. Prokaryotların çoğunda bu enzimlere ilâveten α-ketoglutaratın redüktif aminasyonunu katalizleyen glutamat sentaz enzimi de mevcuttur. Amino grubu vericisi olarak da glutamin kullanılır:

$$\alpha\text{-Ketoglutarat} + Glutamin + NADPH + H^+ \longrightarrow 2Glutamat + NADP^+$$

NH_4^+ miktarının sınırlı olduğu bu organizmalarda glutamat, glutamin sentetaz ve glutamat sentaz enzimlerinin peşpeşe gelen etkileri sonucu sentezlenir. Bir ATP molekülünün harcandığı böyle bir yolun tercih edilmesinin sebebi glutamin sentetazın NH_4^+'e karşı olan yüksek ilgisidir.

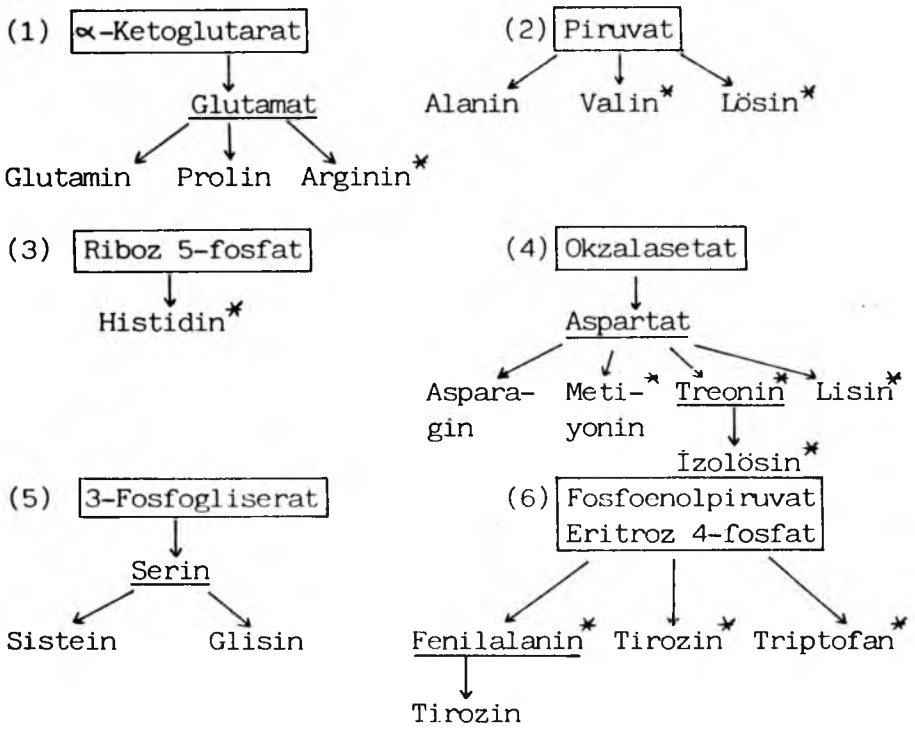
13.3.b. Amino Asitlerin Biyosentezi

Glutamat ve **glutamin** amino asitlerinin biyosentezini azot fiksasyonu bölümünde görmüştük. Şimdi diğerlerinin nasıl sentezlendiğini inceleyeceğiz. E.coli gibi bakteriler, 20 amino asidin tamamını sentezleyebildikleri halde insanda ise ancak yarısı sentezlenir. Sentezlenemeyen amino asitlerin diyetle alınması gerekir. Esensiyal veya ekzojen amino asitler olarak da isimlendirilen bu amino asitlerin listesi Tablo 13.1'de verilmiştir. Söz konusu ayırım belirli şartlarda organizmanın ihtiyaçlarına göredir. Meselâ ergin bir şahsın ihtiyaçları için üre devrinde sentezlenen arginin yeterli iken, büyüme çağındaki çocuklarda kifâyet etmez. Bir amino asidin bile yetersizliği negatif bir azot dengesini netice verir. Böyle bir durumda sentezlendiğinden daha fazla miktarda protein yıkılır ve sonuç olarak da alınandan daha çok azot vücuttan atılır.

Tablo 13.1. Esensiyal ve esensiyal olmayan amino asitler.

Esensiyal olmayan	Esensiyal
Alanin	Arginin
Asparagin	Histidin
Aspartat	İzolösin
Sistein	Lösin
Glutamat	Lisin
Glutamin	Metiyonin
Glisin	Fenilalanin
Prolin	Treonin
Serin	Triptofan
Tirozin	Valin

Amino asitler birbirlerinden farklı yollarla sentezlenmelerine rağmen, hemen hemen hepsinin karbon iskeletleri glikoliz ve pentoz fosfat yolları ve sitrik asit devri ara bileşiklerinden kaynaklanır. Ayrıca sentez yolları altı aileye ayrılırlar(Şekil 13.2)



Şekil 13.2. Amino asitlerin biyosentez aileleri. Başlıca çıkış maddeleri dikdörtgen içinde, kendilerinden başka amino asitlerin de sentezlendiği amino asitler altı çizilerek, esensiyal amino asitler de işaretlenerek gösterilmiştir. İnsanlarda esensiyal amino asitlerin sentez enzimleri yoktur ve bu yollar kapalıdır.

Esensiyal olmayan amino asitler oldukça basit reaksiyonlarla sentezlenirken, esensiyal olanların teşekkülleri ise, nisbeten karmaşık yollarladır. Meselâ **alanin** ve **aspartatın**, piruvat ve okzalasetattan sentezi tek basa-

makta ve bir transaminasyon reaksiyonu ile gerçekleşmektedir. Her iki reaksiyonda da glutamat amino grubu vericisi, piridoksal fosfat da kofaktör olarak görev yapar.

$$\text{Piruvat} + \text{Glutamat} \rightleftharpoons \text{Alanin} + \alpha\text{-Ketoglutarat}$$

$$\text{Okzalasetat} + \text{Glutamat} \rightleftharpoons \text{Aspartat} + \alpha\text{-Ketoglutarat}$$

Asparagin ise daha sonra aspartatın amidleşmesiyle oluşur:

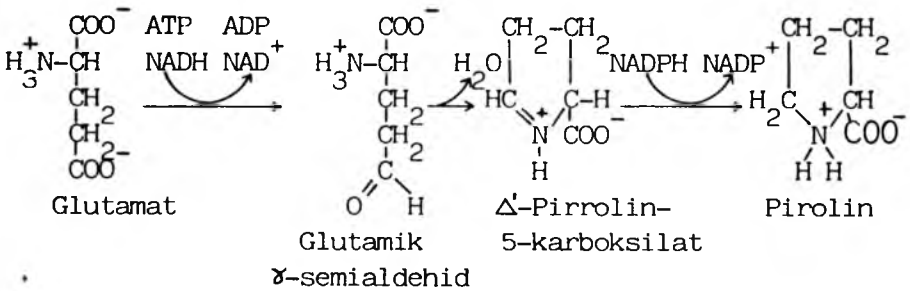
$$\text{Aspartat} + NH_4^+ + \text{ATP} \longrightarrow \text{Asparagin} + \text{AMP} + PP_i + H^+$$

Memelilerde amino grubu NH_4^+ yerine, glutamattan gelmektedir.

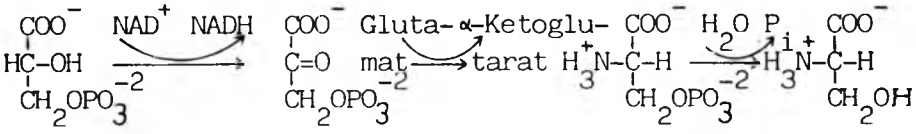
Bir başka tek basamakta sentezlenen esensiyal olmayan amino asit de **tirozin**dir. Bir esensiyal amino asit olan fenilalaninin hidroksilasyonu ile gerçekleşen bu reaksiyon fenilalanin hidroksilaz enzimi tarafından katalizlenir. Bu enzimden mahrum olan canlılarda tirozin de bir esensiyal amino asittir.

$$\text{Fenilalanin} + O_2 + \text{NADPH} + H^+ \longrightarrow \text{Tirozin} + NADP^+ + H_2O$$

Esensiyal olmayan amino asitlerden **prolin** de glutamattan sentezlenir. Önce glutamatın γ-karboksil grubu ATP ile reaksiyona girerek bir açil fosfat oluşturur. Bu karışık anhidrit daha sonra NADH tarafından aldehide indirgenir. Glutamik γ-semialdehid de bir H_2O kaybederek Δ-pirrolin-5-karboksilat halkalı yapıya dönüşür ve bunun da NADPH ile indirgenmesi sonucu prolin hasıl olur.



İnsanda sentezlenebilen amino asitlerden olan **serin** ise, glikoliz yolu ara bileşiklerinden 3-fosfogliserattan çıkılarak türetilir. Önce bu bileşik 3-fosfohidroksipiruvata yükseltgenir. Bu ∝-keto asit de transaminasyonla 3-fosfoserine, bu da hidrolizlenerek serine çevrilir.



3-Fosfogliserat 3-Fosfohidroksipiruvat 3-Fosfoserin Serin

Bazı organizmalarda fosfat bağı hidrolizi, yükseltgenme ve transaminasyondan önce vuku bulur.

3-Fosfogliserat ⟶ Gliserat ⟶ Hidroksipiruvat ⟶ Serin

Glisin ve **sistein** serinden çıkılarak sentezlenir. Glisinin biyosentezinde, serinin β-karbon atomunun bulunduğu yan zinciri tetrahidrofolata aktarılır:

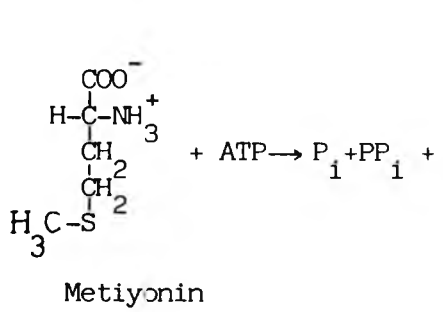
$$\text{Serin} + \text{Tetrahidrofolat} \rightleftharpoons \text{Glisin} + \text{Metilentetrahidrofolat} + H_2O$$

Bu dönüşüm kofaktör olarak piridoksal fosfat kullanan serin transhidroksimetilaz enzimi tarafından katalizlenir. Glisin ikinci bir yol olarak glisin sentaz enziminin etkisiyle CO_2, NH_4^+ ve metilentetrahidrofolattan sentezlenir:

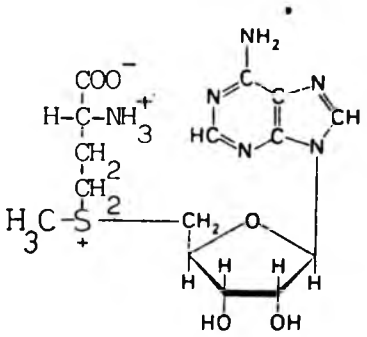
$$CO_2 + NH_4^+ + N^5, N^{10}\text{-Metilentetrahidrofolat} + NADH \rightleftharpoons \text{Glisin} + \text{Tetrahidrofolat} + NAD^+$$

Serinin sisteine çevrilmesi metiyoninden gelen kükürt atomunun yan zincir üzerindeki oksijen atomu yerine sübstitüe edilmesiyle gerçekleştirilir. Metiyoninden gelen kükürt atomları sisteine **aktifleşmiş metil devri** yoluyla oluşan homosisteinden aktarılır. Bu reaksiyonu vermeden önce aktifleşmiş metil devrini izah edelim:

Tetrahidrofolat N^5-atomu üzerinde bir metil grubunu taşıyabilmesine rağmen, bu grubu transfer edebilme potansiyeli yeterince yüksek değildir. Biyosentez reaksiyonlarının çoğunda aktifleşmiş metil vericisi olarak, daha önceden fosfatidil etanolaminin fosfatidil koline çevrilmesinde karşılaştığımız S-adenozilmetiyonin görev yapar. Metiyonin biriminin metil grubu komşu kükürt atomu üzerindeki pozitif yük tarafından aktifleştirilir.



Metiyonin

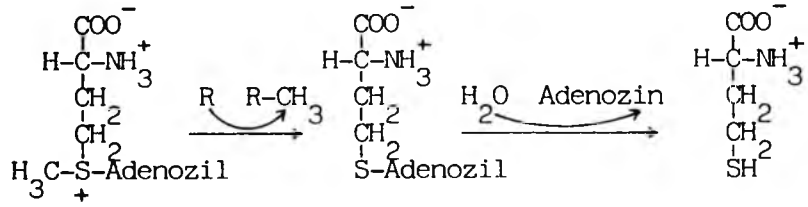


S-Adenozilmetiyonin

S-Adenozilmetiyonin sentezinde, şimdiye kadar gördüğümüz reaksiyonlardan farklı olarak ATP'nin trifosfat grubu pirofosfat ve ortofosfata parçalanmaktadır. Böylece ATP'de mevcut olan bütün yüksek enerjili bağların parçalanmasıyla metil grubunun aktifliği oldukça artmaktadır.

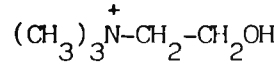
S-Adenozilhomosistein, S-adenozilmetiyonindeki metil grubunun fosfatidil etonolamin gibi bileşiklere akta-

rılması sonucu teşekkül eder. S-Adenozinhomosistein daha sonra homosistein ve adenozine hidroliz olur.

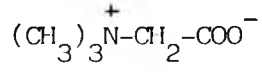


S-Adenozilmetiyonin S-Adenozilhomosistein Homosistein

N^5-Metiltetrahidrofolat metil grubunu, homosistein metiltransferaz enziminin katalizlediği bir reaksiyonla, homosisteine aktararak tekrar metiyonini oluşturur. Bu enzim daha önceden L-metilmalonil CoA'yı süksinil CoA'ya izomerize eden enzimle beraber memelilerde bilinen vitamin B_{12}'ye bağımlı ikinci enzimdir. Homosistein ayrıca kolinin bir oksidasyon ürünü olan betain gibi metil vericileri tarafından da metillenerek metiyonine dönüştürülebilir.

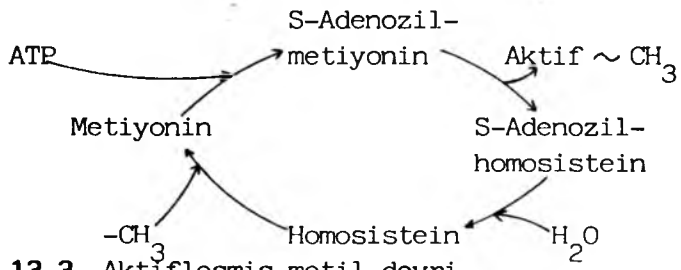


Kolin



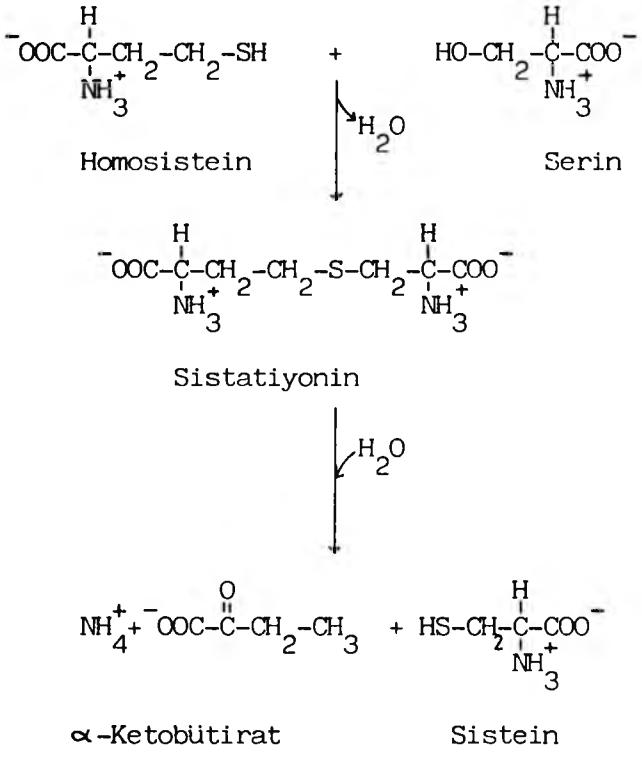
Betain

Bu reaksiyonlar birarada aktifleşmiş metil devrini teşkil ederler. Önce metil grupları homosisteinin metiyonine dönüşümü ile siklüse girer ve üç yüksek enerjili fosfat bağının harcanması ile aktifleştirilir. Böylece yüksek bir transfer potansiyeline kavuşan metil grubu, çok çeşitli alıcılara aktarılabilir(Şekil 13.3).



Şekil 13.3. Aktifleşmiş metil devri.

Homosistein, sistein biyosentezi ara bileşiklerindendir. Önce bir serin molekülü ile kondanse olarak sistatiyonini oluşturur. Sistatiyonin de önce deamine olur ve daha sonra da sistein ve α-ketobütirata parçalanır.



Bu reaksiyonlar sistatiyonin sentetaz ve sistatiyoninaz enzimleri tarafından katalizlenir ve bu iki enzimde de prostetik grup olarak piridoksal fosfat bulunur.

Böylece esensiyal olmayan amino asitlerin biyosentez reaksiyonlarını tamamlamış oluyoruz. Daha önceden de belirttiğimiz gibi, esensiyal amino asitlerin sentez yolları çok daha karmaşıktır. Meselâ eritroz 4-fosfat ve fosfoenolpiruvattan fenilalanin sentezi dokuz basamakta gerçekleşir. Bu reaksiyonlara memelilerde rastlanmadığından üzerinde durmayacağız.

13.3.c. Amino Asitlerden Türetilen Önemli Biyomoleküller

Amino asitler proteinlerin yapı taşları olarak görev yaptıkları gibi, değişik hormonlar, vitaminler, koenzimler, alkaloidler, porfirinler, antibiyotikler, pigmentler ve nörotransmitterlerin de ön maddeleridir. Tablo 13.2'de amino asitlerden türetilen biyomoleküllere bazı örnekler verilmiştir. Şimdi amino asitlerden türetilen bazı önemli biyomoleküllerin oluşumunu ve fonksiyonlarını görelim:

Tablo 13.2. Amino asitlerden türetilen bazı biyomoleküller

Arginin	Serin
Spermin	Sfingozin
Spermidin	Tirozin
Putreskin	Adrenalin (epinefrin)
Aspartik asit	Noradrenalin (norepinefrin)
Pirimidin	Melanin
Glutamik asit	Tiroksin
Glutatyon	Meskalin
Glisin	Tiramin
Pürin	Morfin
Glutatyon	Kodein
Kreatin	Papaverin
Fosfokreatin	Triptofan
Tetrapirrol	Kinurenik asit
Histidin	İndol
Histamin	Skatol
Ergotiyonein	İndol asetik asit
Lisin	Nikotinik asit
Kadaverin	Serotonin
Anabasin	Valin
Koniin	Pantotenik asit
	Penisilin

Glutatyon: Hayvansal dokularda bulunan glutatyon bir tripeptiddir: ɣ-L-glutamil-L-sisteinilglisin. Glutat-

glutatyonun sentez mekanizması bilinmeyecek

yon, L-glutamat, L-sistein ve glisinden iki basamakta sentezlenir. Oluşan her peptid bağı için bir molekül ATP harcanır:

$$\text{L-Glutamat} + \text{L-Sistein} + \text{ATP} \xrightarrow[\text{sentetaz}]{\gamma\text{-Glutamilsistein}} \gamma\text{-Glutamil-sistein} + \text{ADP} + P_i$$

$$\gamma\text{-Glutamil-sistein} + \text{Glisin} + \text{ATP} \xrightarrow[\text{sentetaz}]{\text{Glutatyon}} \text{Glutatyon} + \text{ADP} + P_i$$

Glutatyon, belirli hayvansal dokuların hücrelerinde amino asitlerin hücre içine taşınmasında rol alır. Membrana bağlı bir enzim olan γ-glutamat transferaz katalizörlüğünde, amino asit glutatyonla aşağıdaki reaksiyona göre birleşir:

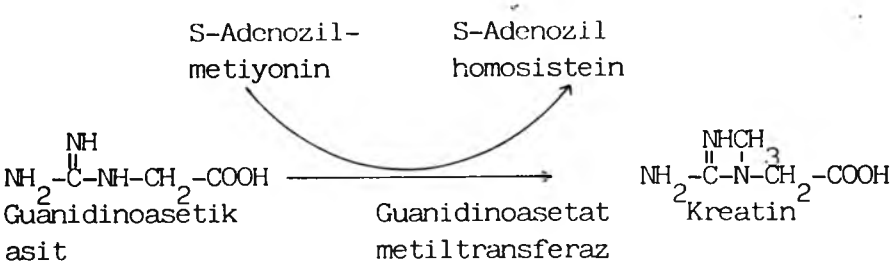
$$\text{Amino asit} + \text{Glutatyon} \longrightarrow \gamma\text{-Glutamil amino asit} + \text{Sisteinilglisin}$$

Daha sonra sitozolde bulunan 5 enzim beraberliğinde amino asit serbest hale geçerken, glutatyon geri kazanılır.

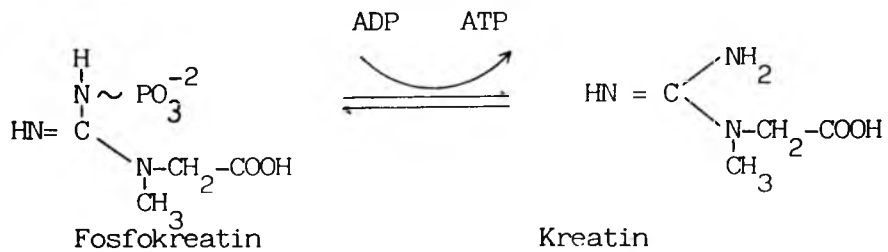
Glutatyon, ayrıca belirli enzimlerin aktivatörü ve lipidlerin oksidasyonunu önleyici olarak (bak s.325) da görev yapmaktadır.

Kreatin ve fosfokreatin: α-Metilguanidoasetik asit kimyasal yapısında olan kreatin, arginin, glisin ve metiyoninden iki basamakta oluşur:

$$\text{Arginin} + \text{Glisin} \xrightarrow[\text{transferaz}]{\text{Glisinamidino-}} \text{Ornitin} + \text{Guanidinoasetik asit}$$

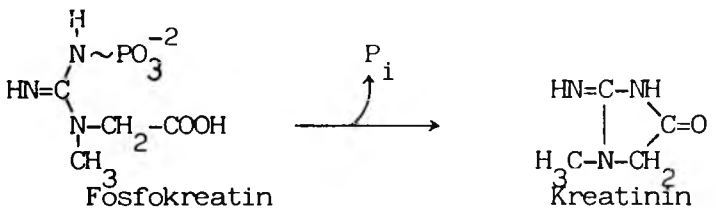


Kas, karaciğer ve az miktarda da kanda bulunan kreatinin en büyük kısmı yüksek enerjili bir fosfat bileşiği olan fosfokreatin şeklindedir. Fosfokreatinin kas kasılmasında rolü vardır. Kaslarda fosfokreatin konsantrasyonu ATP'den yaklaşık 5 kat daha fazladır. Yüksek enerjili fosfat grubu, sarkoplazmada bulunan, kreatin kinaz vasıtasıyla çok hızlı bir şekilde ADP'ye taşınır.

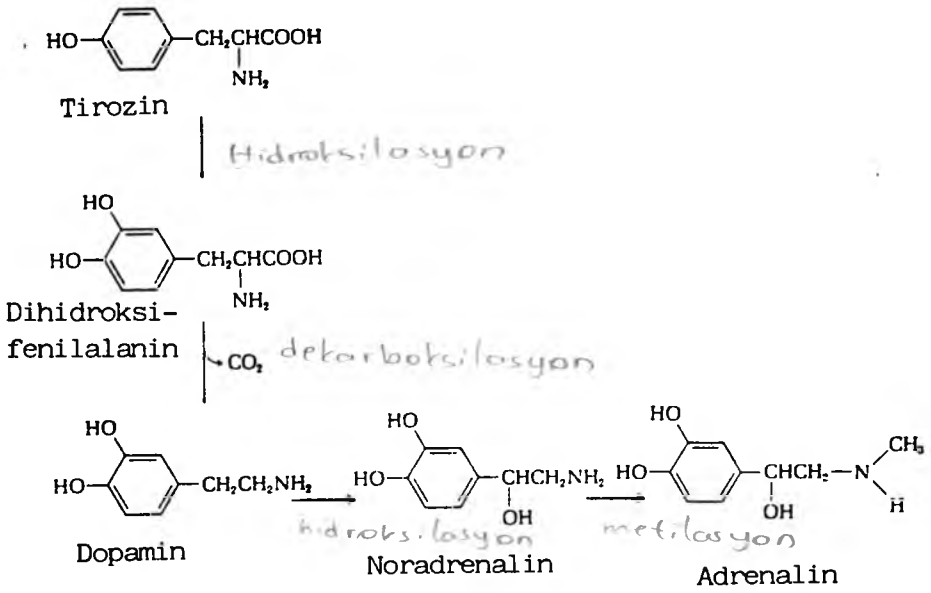


Bu reaksiyon kas kasılması esnasında gerçekleştirilir. Böylece fosfokreatin kasların birdenbire kasılmalarında kullanılabilen hazır bir enerji kaynağı görevini üslenir. Oluşan ATP ise kas kasılmasını sağlar. Dinlenme esnasında yukarıdaki reaksiyonun tersine işlemesiyle kreatin tekrar fosfokreatine dönüşür.

Kreatin fosfattan inorganik fosfatın kendiliğinden ayrılmasıyla **kreatinin** oluşur ve bu kreatinin de idrarla dışarı atılır:



Adrenalin ve noradrenalin: Böbreküstü bezinin medulla kısmından salgılanan bu hormonlar, L-tirozinden meydana gelirler. Tirozin önce 3,4-dihidroksifenilalanin (dopa)'e yükseltgenir. Dopa dekarboksilasyonla 3,4-dihidroksifeniletilamin (dopamin)'e dönüşür. Daha sonra yan zincirin hidroksilasyonuyla norepinefin meydana gelir. Norepinefrinin de metillenmesiyle adrenalin oluşur(Şekil 13.4).

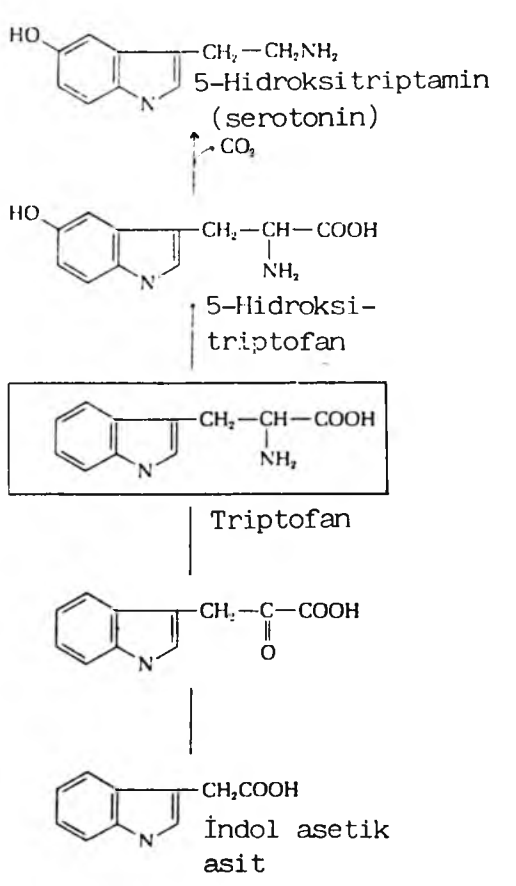


Şekil 13.4. L-Tirozinin noradrenalin ve adrenaline dönüşümü.

Her iki hormon, kalp atışlarının ve kan basıncının düzenlenmesinde fizyolojik etkiye sahiptirler. Ayrıca adrenalin, karaciğerde ve kaslarda adenilat siklaz enzimini uyararak glikojen yıkımının aktivatörü olarak görev yapar. Bu olayların mekanizması "Hormonlar" bölümünde ele alınacaktır.

Dopa, aynı zamanda melanin, koyu saç ve deri pigmentleri oluşumunun ara ürünüdür. **Dopamin** ise, nörotransmitter role sahiptir.

Serotonin ve indolasetik asit: Omurgalılarda vazokonstriktorik (damar daraltıcı) olarak etki yapan serotonin (5-hidroksitriptamin), triptofandan meydana gelir. Merkezi sinir sisteminde de bulunmuş olup, burada büyük ihtimalle transport maddesi olarak fonksiyon görür. Bir bitkisel büyüme hormonu olan indolasetik asit de triptofandan teşekkül eder(Şekil 13.5).



Şekil 13.5. Serotonin ve indolasetik asidin triptofandan teşekkülü.

Spermin ve spermidin: Poliaminler sınıfından olan spermin ve spermidin bütün bakteriler ve çoğu hayvansal hücrelerde bulunmaktadır.

$$NH_2-CH_2-CH_2-CH_2-NH-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-NH_2$$

Spermidin

$NH_2-CH_2-CH_2-CH_2-NH-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-NH-CH_2-CH_2-CH_2-NH_2$

Spermin

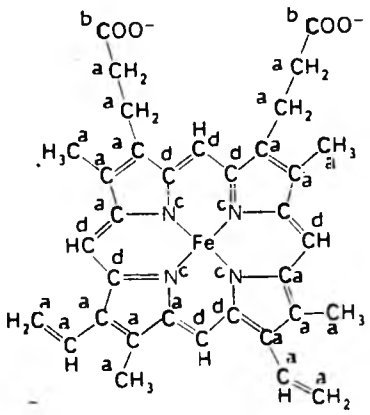
Spermin ve spermidin, bazı mikroorganizmalar için büyüme faktörleridirler ve bakteriyel membranların, ribozomların, bazı virüslerin ve bazı organizmalarda DNA'nın yapısının dayanıklığını sağlarlar. Putreskin ve S-adenozilmetiyoninden meydana gelirler. Putreskin ($NH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-NH_2$), memeli hayvanlarda ornitinin dekarboksilasyonundan, E-coli'de ise argininden oluşur.

Yukarıda sayılan amino asitlerden türetilen biyomoleküllerden başka, DNA,RNA ve birçok koenzimin yapı taşı olan pürin ve pirimidin bazları kısmen amino asitlerden türetilir. Bu reaksiyonlar bir sonraki bölümde ele alınacaktır. Sfingozinin aktif ucu serinden, kuvvetli bir vazodilatör (damar genişletici) olup akciğer, karaciğer ve ince bağırsak mukozasından salgılanan histamin, histidinin dekarboksilasyonundan oluşur. Tiroksin hormonu tirozinden, NAD^+'nin nikotinamid halkası da triptofandan sentezlenmektedir.

13.3.d. Porfirinlerin Sentezi

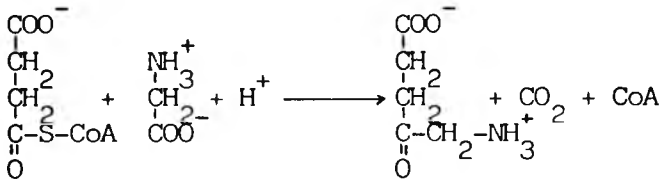
Hem ve klorofil yapısındaki porfirin halkalarının sentezinde amino asitlerin payı ilk defa 1945 yılında David Shemin ve arkadaşlarının çalışmalarıyla ortaya koyulmuştur. ^{15}N-Glisinle beslenen insanlarda hemin azot atomlarının işaretlenmiş olduğu, ^{15}N-glutamatın ise çok az oranda işaretlenmeyi netice verdiği gözlenmiştir. ^{14}C-Glisinle yapılan denemeler hem yapısındaki 8 karbon atomunun glisinin α-karbonundan kaynaklandığını, karboksil karbonunun yapıda yer almadığını göstermiştir. Bundan sonra metil grubu ^{14}C'la işaretlenmiş asetat verildiği zaman geride kalan 26 karbonun 24'ünün asetat metil grubundan, iki tanesinin karboksil grubundan kaynaklandığı bulunmuştur.

Asetat Glisin



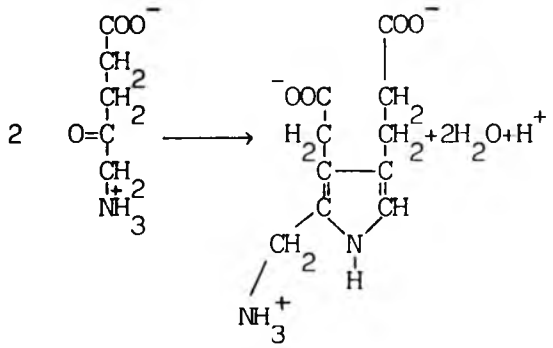
Hem

Bu deneylerin sonucu Shemin'i glisin ile süksinil CoA'nın kondanse olarak hemin bir ön maddesi olan δ-aminolevulinatı oluşturduğu sonucuna götürdü.



Süksinil CoA Glisin δ-Aminolevulinat

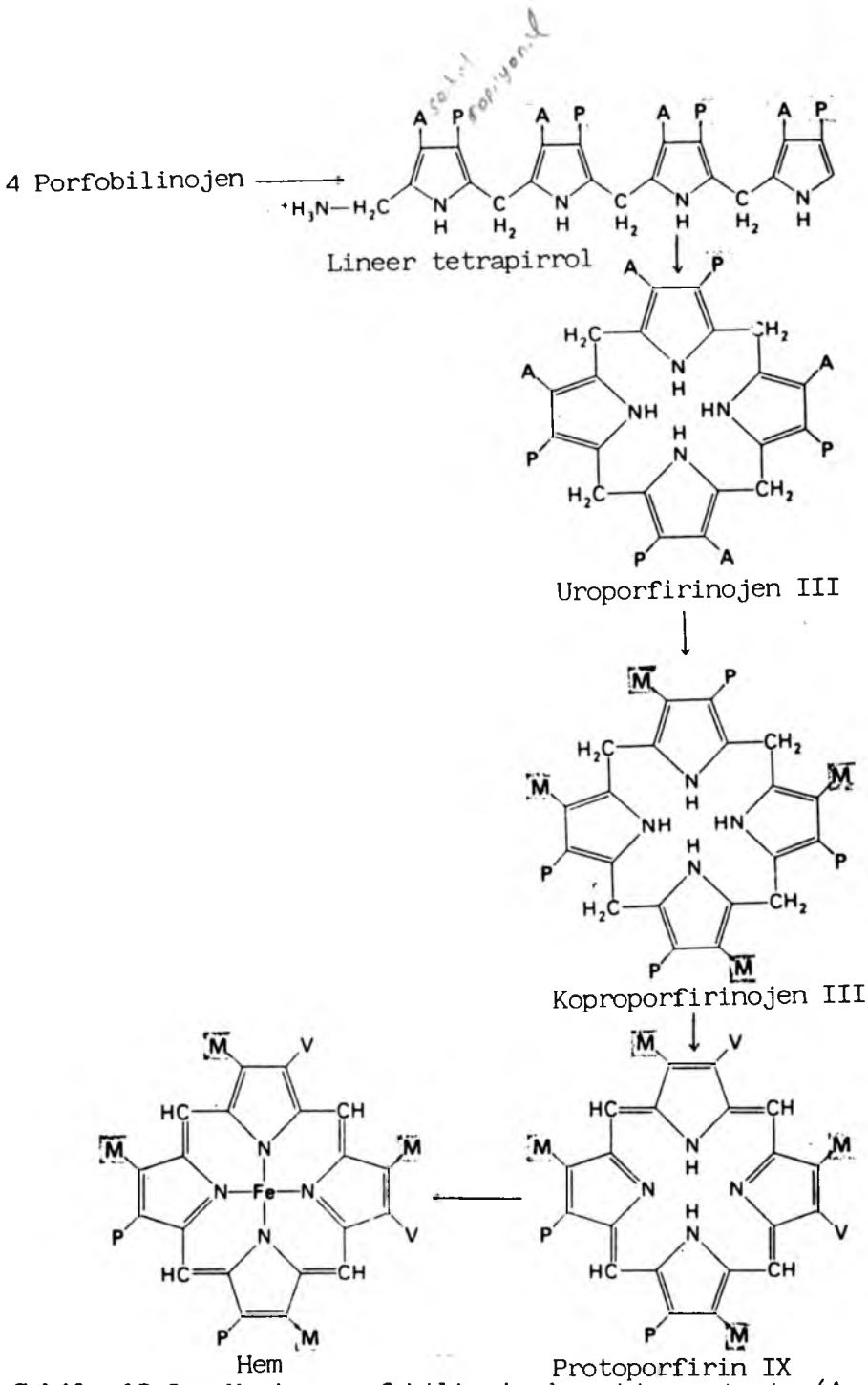
Bu reaksiyon, mitokondride bulunan ve piridoksal fosfat kofaktörüyle çalışan δ-aminolevulinat sentetaz enzimi tarafından dönüşümsüz olarak katalizlenir. Daha sonra iki δ-aminolevulinat kondanse olarak porfobilinojeni meydana getirirler. Bu dehidrasyon reaksiyonu δ-aminolevulinat dehidraz enzimi tarafından gerçekleştirilir.



δ-Aminolevulinat Porfobilinojen

Bundan sonra dört tane porfobilinojen molekülü baştan kuyruğa kondanse olarak bir lineer tetrapirrol meydana getirir. Oluşan herbir metilen köprüsü başına bir NH_4^+ iyonu salınır. Bu lineer tetrapirrol daha sonra bir NH_4^+ kaybederek uroporfirinojen III adı verilen halkalı bir yapı kazanır. Bu bileşikte yan zincirler asimetrik bir düzendedir. Bir sentetaz, bir de kosentetaz enzimi sözü edilen reaksiyonları katalizler. Böylece porfirin halkası teşekkül etmiş durumdadır. Bundan sonraki reaksiyonlar yan zincirlerde ve halkanın doymuşluk derecesinde değişiklikler yapar. Asetat yan zincirlerinin dekarboksilasyonu ile koproporfirinojen III ortaya çıkar. Porfirin halkasının dehidrogenasyonu ve iki propiyonat yan zincirinin vinil gruplarına çevrilmesi sonucu da protoporfirin IX teşekkül eder. Son olarak da bir demir iyonunun bu halka ile çelat bağı yapmasıyla miyoglobin, hemoglobin, katalaz, peroksidaz ve sitokrom c gibi proteinlerin prostetik grubu olan hem meydana gelir(Şekil 13.6). Demirin Fe^{+2} (ferrous) şeklinin porfirin halkasına sokulması reaksiyonu ferroçelataz enzimi tarafından katalizlenir. Demir, kanda iki tane Fe^{+3} bağlayabilen transferrin proteini tarafından taşınır ve dokularda ferritin proteininin içine depolanır. Yarıçapı 80 A° civarında büyük bir oyuğa sahip olan bu protein yaklaşık 4500 Fe^{+3} iyonu tutabilecek kapasitededir.

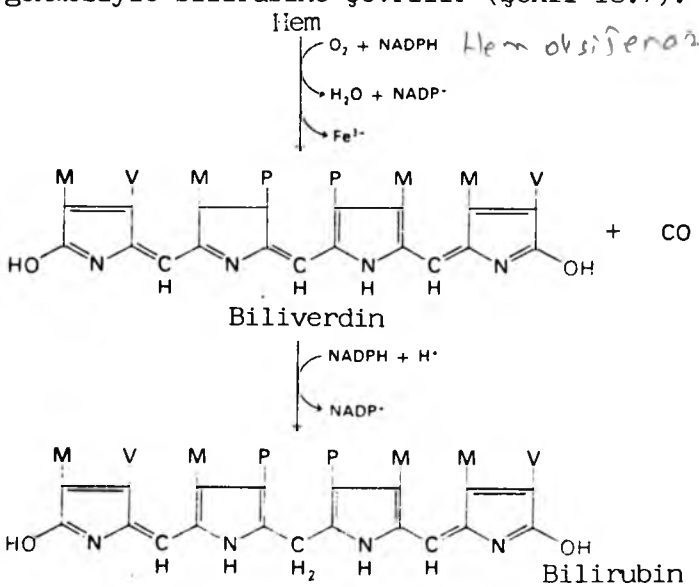
Hayvanlarda hem biyosentezini düzenleyen muhtelif



Şekil 13.6. Hemin porfobilinojenden biyosentezi (A: asetat, M: metil, P: propiyonat, V: vinil).

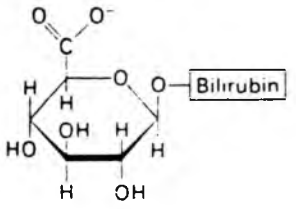
faktörler belirlenmiştir. Reaksiyonu dönüşümsüz olarak katalizleyen δ-aminolevulinat sentetaz enzimi ve δ-aminolevulinat dehidraz ile ferroçelataz enzimleri hem tarafından feedback mekanizması ile inhibe edilirler. Enzimlerin biyosentezi noktasında da bir düzenleme söz konusudur. Hem, δ-aminolevulinat sentetaz sentezini baskılar. Son yapılan araştırmalar demir atomunun kendisinin de aktif bir düzenleyici faktör olduğunu ortaya koymuştur.

Hemoglobinin yıkımı: Normal insan eritrositinin ortalama ömrü 120 gündür. Yaşlı hücreler dolaşımdan uzaklaştırılır ve retikülo endotelyal sistem (karaciğer, dalak ve kemik iliği)tarafından yıkılır. Hemoglobinin protein kısmı amino asitlere kadar hidrolizlenir. Hem grubunun yıkımında ilk basamak, α-meten köprüsünün parçalanarak lineer bir tetrapirrol olan biliverdinin teşekkülüdür. Bu reaksiyon bir monooksigenaz olan ve O_2 ile NADPH kullanan hem oksigenaz enzimi tarafından katalizlenir. Burada uzaklaştırılan meten köprüsü karbonu, karbon monokside dönüştürülür. Daha sonra biliverdin, ortasında yer alan meten köprüsünün NADPH bağlı redüktaz enzimi tarafından indirgenmesiyle bilirubine çevrilir (Şekil 13.7).



Şekil 13.7. Hemin bilirubine yıkımı.

Hemin yıkımından teşekkül eden bilirubinin büyük kısmı albüminle, az bir kısmı da α_1- ve α_2 globulinlerle kompleks yaparak kan dolaşımı ile karaciğere taşınır. Proteinle kompleks oluşturmuş olan bilirubin suda çözünür, fakat idrarla atılmaz. Bilirubin karaciğerde proteinden ayrılır ve bilirubin UDP-glukuroniltransferazın katalizörlüğünde glukuronata bağlanır; böylece bilirubin mono- ve diglukuronidleri teşekkül eder. Monoglukuronidlerde glukuronatın yarı astal grubunun hidroksili, bilirubinin ortadaki halkalarından birinin, diglukuronidlerde ise her ikisinin propiyonat grubuyla ester bağı oluşturur.

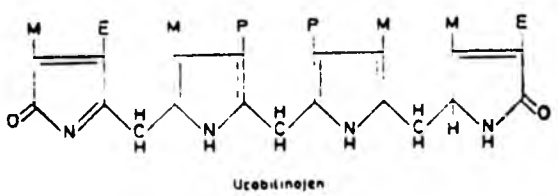


Bilirubine bağlanmış
glukuronat birimi

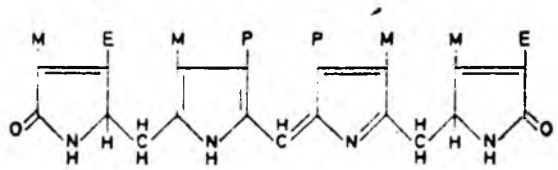
Bilirubin-glukuronid diazolanmış sülfanilik asitle anında kırmızı bir renk (direkt van den Bergh reaksiyonu) verirken, serbest bilirubin ancak alkol katılması sonucu proteinlerin çöktürülmesinden sonra renk vermektedir (indirekt van den Bergh reaksiyonu). Kanda bilirubin miktarı bu metodla tayin edilebilir.

Bilirubinin bir kısmı da serbest hidroksil grupları vasıtasıyla sülfat gruplarıyla esterleşir. Bu suretle glukuronat ve sülfatla esterleşen konjuge bilirubin ile serbest bilirubin safraya karışır; daha sonra ince bağırsağa geçer. Burada konjuge bilirubin hidroliz olur, serbest hale geçen bilirubin az bir kısmı emilerek tekrar karaciğere gelir. Arta kalan bilirubinin bir kısmı bağırsak bakterileri tarafından uçtaki pirrol halkalarına komşu olan meten köprülerinin ve vinil gruplarının hidrojen-

asyonu ile urobilinojene dönüşür. Bir kısmı da urobilinojendeki indirgemelere ek olarak dıştaki iki pirrol halkasının hidrojenasyonu ile sterkobilinojene dönüşür (-ojen şeklinde isimlendirilen boyar maddelerde tüm pirrol halkaları $-CH_2-$ grubu ile birbirine bağlanmışlardır). Urobilinojen ve sterkobilinojen renksiz maddeler olup, bunların bir kısmı kalın bağırsakta dehidrojene olarak sarı-turuncu renkli maddeler olan urobilin ve sterkobiline yükseltgenir. Urobilin ve sterkobilin dışkı ile dışarı atılır. Dışkının rengi bunlardan gelir. Yükseltgenmiyen urobilinojenin bir kısmı venaporta yoluyla karaciğere gelerek tekrar bilirubine dönüşür ve safra yoluyla tekrar bağırsağa döner. Sterkobilinojenin çok az bir kısmı büyük dolaşıma geçer, karaciğer tarafından alınmadığı için idrarla atılır. İdrarla atılan kısmı havayla temas ettiğinde sterkobiline yükseltgenir.



Urobilinojen



Urobilin

Vücutta eritrosit yıkımının yani hemolizin arttığı patolojik hallerde kanda serbest bilirubin artar, ancak idrara çıkamaz. Büyük kısmı safra ile bağırsağa aktığı halde, bir kısmı mukozalara derilere yerleşerek onları sarı renkli gösterir. Buna **hemolitik sarılık** ve oluşum yerine göre de **karaciğer öncesi sarılığı** denir.

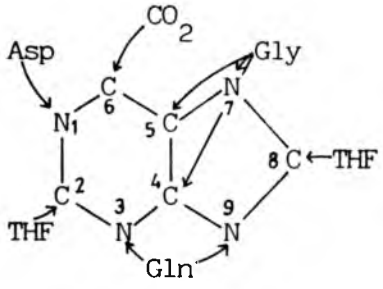
Konjuge bilirubin, safra kanalcıklarına veya ince bağırsaklara boşaltımının aksadığı hallerde (safra yolu veya safra kesesinin tıkanması gibi) kana geçer,dokularda toplanarak sarılık tablosu ortaya çıkar. Daha sonra idrarla atılır ve bilirubinüri görülür. Bu tür sarılıklara **mekanik sarılık** ve oluşum yerine göre de **karaciğer sonrası sarılığı** denir. Yine karaciğerde virüslü bir iltihap (hepatit) olursa veya alkol, ilaç gibi toksik sebeplerle karaciğer hasar görürse, çoğu kez karaciğer bilirubini glukuronitlediği halde safra yollarına salgılamasında bozukluk olabilir. Bu durumda bilirubin kana ve daha sonra idrara geçer. Bu tür sarılığa da **hepatoselüler sarılık** ve oluşum yerine göre de karaciğerin kendinden gelen sarılık anlamında **hepatojen sarılık** denir.

14. BÖLÜM: NÜKLEOTİD METABOLİZMASI

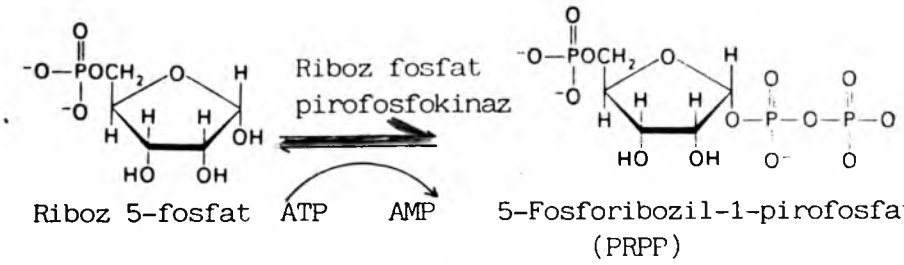
Bu bölümde nükleotidlerin biyosentezleri ve yıkım ürünleri anlatıldıktan sonra bazı önemli bileşiklerin nükleotidlerden sentezi incelenecektir.

14.1. Pürin Halkasının Biyosentezi

Pürin nükleotidlerindeki pürin halkası atomları muhtelif bileşiklerden gelmektedir. C-4, C-5 ve N-7 atomları glisinden, N-1 aspartattan, N-3 ve N-9 glutaminin amid grubundan, C-2 ve C-8 aktifleşmiş tetrahidrofolat türevlerinden ve C-6 da CO_2'den kaynaklanmaktadır.



Pürin biyosentezi yolu, 1950 yıllarında John Buchanan, G.Robert Greenberg ve arkadaşları tarafından aydınlatılmıştır. Pürin ve pirimidin nükleotidlerin riboz fosfat kısmı 5-fosforibozil-1-pirofosfat (PRPP)'tan gelmektedir. PRPP bakterilerde aynı zamanda histidin ve triptofan biyosentezinde önemli bir ara bileşiktir. Bu bileşik pentoz fosfat yolunda sentezlenen riboz 5-fosfat ve ATP'den teşekkül eder. ATP'nin pirofosfat grubu riboz 5-fosfatın C-1 atomuna aktarılır. PRPP α-konfigürasyonuna sahiptir.

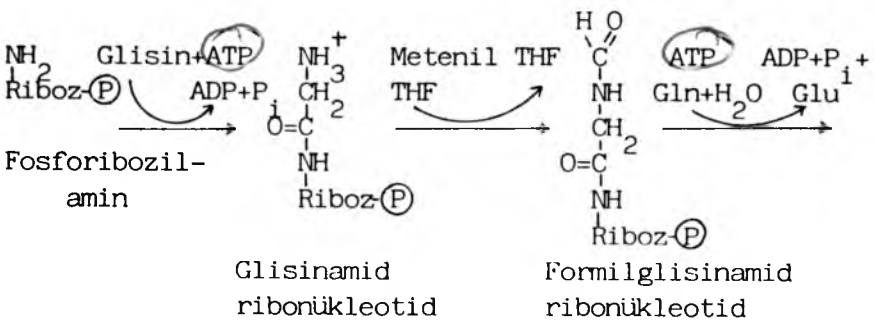


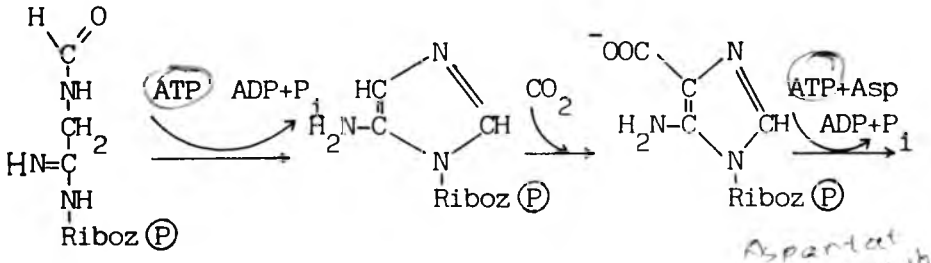
Pürin nükleotidleri sentezinin ilk basamağı PRPP ve glutaminden 5-fosforibozilaminin dönüşümsüz olarak teşekkülüdür. Glutamin yan zincirindeki amino grubu, PRPP'nin C-1 atomuna bağlı pirofosfatın yerine geçer. Bu reaksiyonla C-1'deki konfigürasyondan α'dan β'ya değişir. Bu C-N bağındaki konfigürasyonu, bütün tabii nükleotidlerin genel bir karakteristiğidir. Bu reaksiyon, PP_i'nin hidroliziyle daha da sağa kaydığından dönüşümsüzdür.

Daha sonra glisin, fosforibozilglisinamid sentetaz katalizörlüğünde fosforibozilamin ile birleşerek glisinamid ribonükleotidi verir. Glisinin karboksil grubu ile fosforibozilaminin amino grubu arasındaki bu amid bağının oluşması için bir ATP harcanır. Bundan sonra glisinin amino grubu fosforibozilglisinamid formiltransferaz beraberliğinde meteniltetrahidrofolat tarafından formillenerek α-N-formilglisinamid ribonükleotid meydana gelir. Bir ATP'nin daha harcandığı, glutamin yan zincirindeki amino grubunu verdiği ve fosforibozilformilglisinamidin sentetazın katalizlediği bir reaksiyonla bu bileşiğin amid grubu amidine çevrilir. Oluşan formilglisinamidin,

bir halka kapanmasına maruz kalarak pürin iskeletinin beş atomlu halkasının tamamlandığı 5-aminoimidazol ribonükleotidi meydana getirir. Bir ATP'nin harcandığı bu reaksiyon fosforibozilaminoimidazol sentetaz tarafından katalizlenir.

Pürin iskeletinin bundan sonraki safhası altı atomlu halkasının 5-aminoimidazol ribonükleotidden başlayarak sentezlenmesidir. Zaten bu halkanın üç atomu aminoimidazol ribonükleotidde mevcuttur. Geride kalan üçü CO_2, aspartat ve formiltetrahidrofolattan gelir. İlk karbon fosforibozilaminoimidazol karboksilaz beraberliğinde aminoimidazol ribonükleotidin karboksilasyonu ile halkaya sokulur ve bu esnada 5-aminoimidazol-4-karboksilat ribonükleotid oluşur. Daha sonra aspartatın amino grubu, bu ara bileşiğin karboksil grubuyla reaksiyona girerek, bir ATP harcanmasıyla fosforibozilaminoimidazol süksinokarboksamid sentetaz katalizörlüğünde bir amid bağı teşekkül eder. Oluşan ara bileşiğin aspartat kısmının karbon iskeleti adenilosüksinat liyaz vasıtasıyla fumarat olarak ayrılır ve 5-aminoimidazol-4-karboksamid ribonükleotid meydana gelir. Pürin halkasının son atomu N^{10}-formiltetrahidrofolattan gelir. Bir transferaz enzimi vasıtasıyla oluşan 5- formamidoimidazol-4-karboksamid ribonükleotid ara bileşiği IMP-siklohidrolaz katalizörlüğünde dehidrasyonla halka kapanmasına maruz kalarak tam bir pürin halkasına sahip olan inosinat (IMP) nükleotidini meydana getirir. Bu nükleotidin pürin bazı hipoksantindir. Şimdi fosforibozilaminden inosinata kadar reaksiyon basamaklarını özetleyelim:

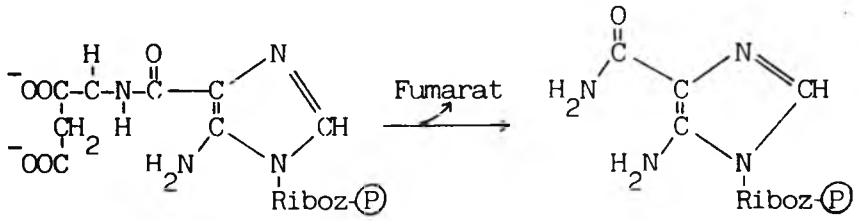




Formilglisinamidin ribonükleotid

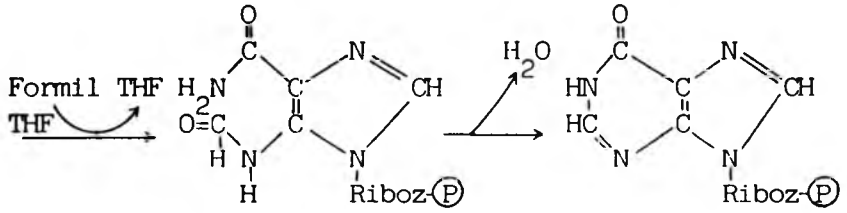
5-Aminoimidazol ribonükleotid

5-Aminoimidazol-4-karboksilat ribonükleotid



5-Aminoimidazol-4-N-süksinokarboksamid ribonükleotid

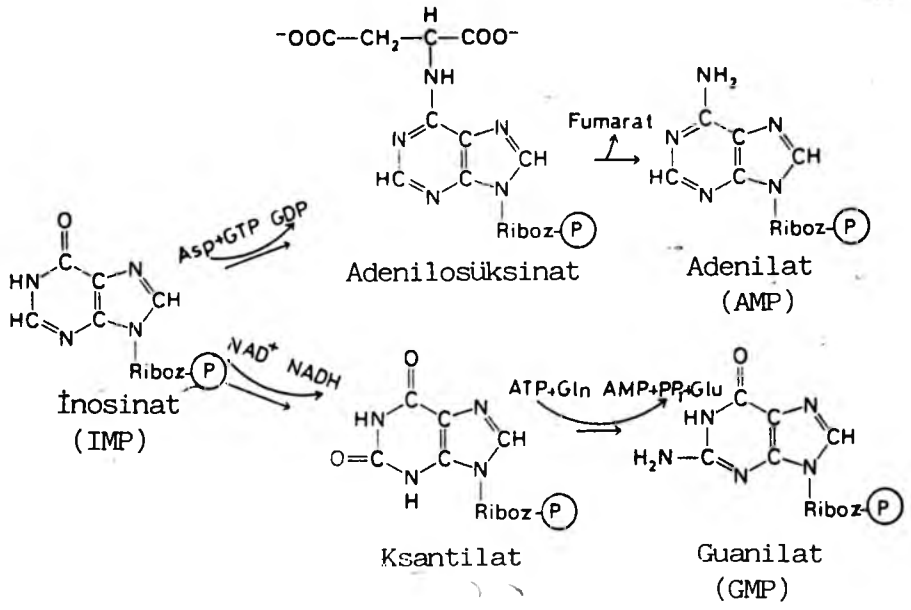
5-Aminoimidazol-4-karboksamid ribonükleotid



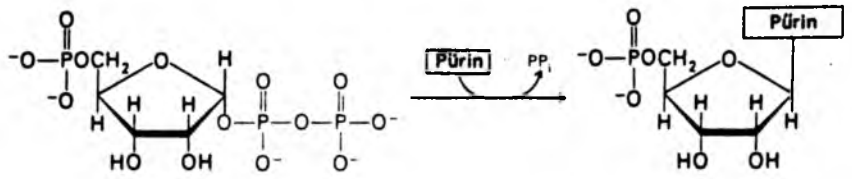
5-Formamidoimidazol-4-karboksamid ribonükleotid

Inosinat (IMP)

İnosinat, AMP ve GMP'nin ön maddesidir. İnosinatın C-6 karbonuna bir amino grubu takılmasıyla adenilat, C-2 karbonuna bir amino grubu takılmasıyla da guanilat oluşur. Bu reaksiyonları özetliyerek yazalım:



Nükleik asit ve nükleotidlerin hidrolizi ile serbest pürin bazları ortaya çıkar. Pürin nükleotidlerinin bu bazlardan tekrar sentezi yukarıda anlattığımız yoldan daha az maliyetlidir. Bu sentez yolunda PRPP'nin riboz fosfat kısmı pürine aktarılarak bu pürinin nükleotidi meydana gelir.



PRPP Pürinribonükleotid

Bu reaksiyonu katalizleyen farklı spesifiklikte iki enzim vardır. Adenin fosforibozil transferaz adenilat oluşumunu katalizler.

$$\text{Adenin+PRPP} \longrightarrow \text{Adenilat+PP}_i$$

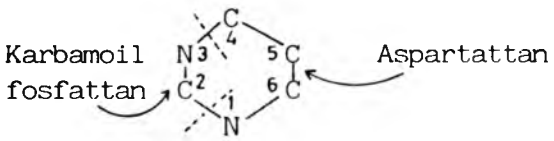
Diğer enzim, hipoksantin-guanin fosforibozil transferaz inosinat ve guanilat teşekkülünü gerçekleştirir:

$$\text{Hipoksantin+PRPP} \longrightarrow \text{İnosinat+PP}_i$$
$$\text{Guanin+PRPP} \longrightarrow \text{Guanilat+PP}_i$$

Pürin nükleotidlerinin biyosentezi AMP ve GMP tarafından feed-back mekanizmasıyla kontrol edilir.

14.2. Pirimidin Halkasının Sentezi

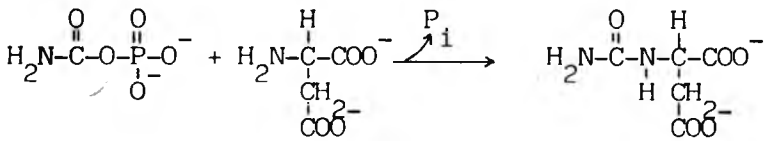
Pürin nükleotidlerinin aksine, pirimidin nükleotidlerinde önce pirimidin halkası sentezlenir, sonra da riboz fosfat birimi takılır. Burada yine PRPP, riboz fosfat vericisi olarak görev yapar. Pirimidin halkasının ön maddeleri karbamoil fosfat ve aspartattır.



Pirimidinlerin biyosentezi, yine üre sentezinin bir ara bileşiği olan karbamoil fosfatın yapımıyla başlar. Pirimidin sentezinde kullanılan karbamoil fosfat ökaryotlarda sitozolde sentezlenir. Üre siklüsü ara bileşiği ise, mitokondride teşekkül etmekteydi. Birbirinden farklı iki karbamoil fosfat sentetaz enzimi vardır. Sitozolde oluşan karbamoil fosfatta azot kaynağı olarak NH_4^+ yerine glutamin kullanılır.

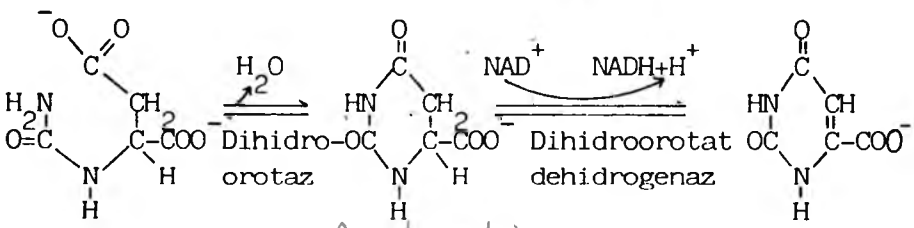
$$\text{Glutamin+2ATP+}HCO_3^- \longrightarrow \text{Karbamoil fosfat+2ADP+}P_i\text{+Glutamat}$$

Pirimidin sentezinin dönüşümsüz kontrol reaksiyonu aspartat ve karbamoil fosfattan N-karbamoilaspartatın teşekkülüdür. Bu reaksiyon özellikle ilgi çekici bir düzenleyici enzim olan aspartat transkarbamoilaz tarafından katalizlenir.



Karbamoil fosfat Aspartat N-Karbamoilaspartat

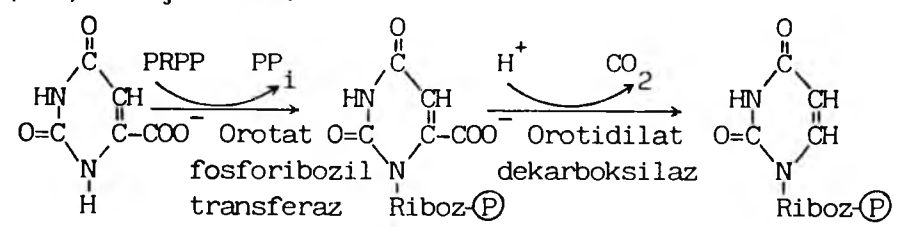
Bundan sonra N-karbamoilaspartat, bir su molekülü kaybederek pirimidin halkasına sahip dihidroorotatı meydana getirir. Bu da dehidrogenasyonla orotata çevrilir.



Amid reaksiyonu dur.

N-Karbamoilaspartat Dihidroorotat Orotat

Bundan sonraki safha, serbest bir pirimidin olan orotatın bir riboz fosfat kazanmasıdır. Bu da bir PRPP ile reaksiyona girip, orotidilatı oluşturmasıyla gerçekleştirilir. Orotidilat da dekarboksile olarak üridilata (UMP) dönüştürülür.



Orotat Orotidilat Üridilat(UMP)

Biyosentez ve enerji dönüşümü olaylarında görev yapan nükleotidlerin aktif şekilleri, onların difosfat ve trifosfat halleridir. Nükleosit monofosfatlar ATP'yi fosforil grubu vericisi olarak kullanan spesifik nükleosit monofosfat kinazlar tarafından dönüştürülür. Meselâ UMP, UMP kinaz enzimi tarafından fosforillenir.

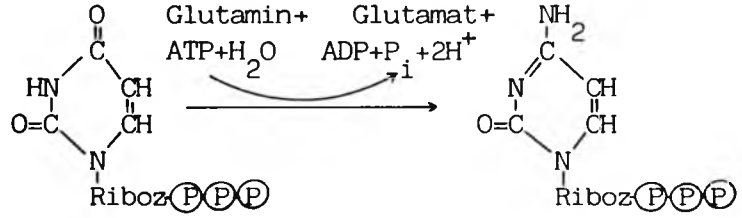
$$UMP + ATP \rightleftharpoons UDP + ADP$$

AMP, ADP ve ATP, birbirlerine adenilat kinaz (miyokinaz adı da verilir) enzimi katalizörlüğü ile çevrilir.

Nükleosit difosfatlar ve trifosfatlar birbirlerine monofosfat kinazlara nisbeten daha geniş bir substrat spesifikliği olan nükleosit difosfat kinaz enzimi tarafından çevrilir. Aşağıdaki denklemde X ve Y, herhangi bir ribo- veya deoksiribonükleosit olabilir:

$$XDP + YTP \rightleftharpoons XTP + YDP$$

Sitidin trifosfat (CTP) UTP'den türetilir. C-4'deki karbonil oksijeni amino grubu ile yer değiştirir. Memelilerde amino grubu vericisi, glutaminin yan zinciridir. E.coli'de ise bu maksatla NH_4^+ kullanılır. Bu aminasyon reaksiyonlarında bir molekül ATP harcanır.



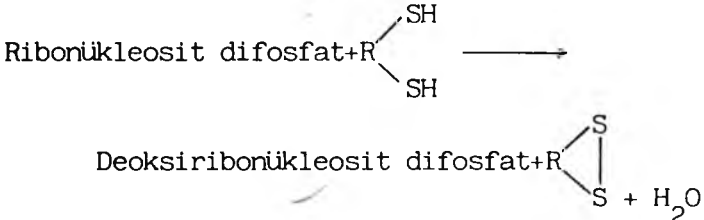
UTP CTP

Deoksiribonükleotidler, ribonükleosit difosfatların indirgenmesiyle sentezlenir. DNA'nın bu aktifleşmiş ön maddeleri, ribonükleotidlerin riboz 2-hidroksil grubunun hidrojen ile yer değiştirmesi sonucu oluşur. Bu olayın

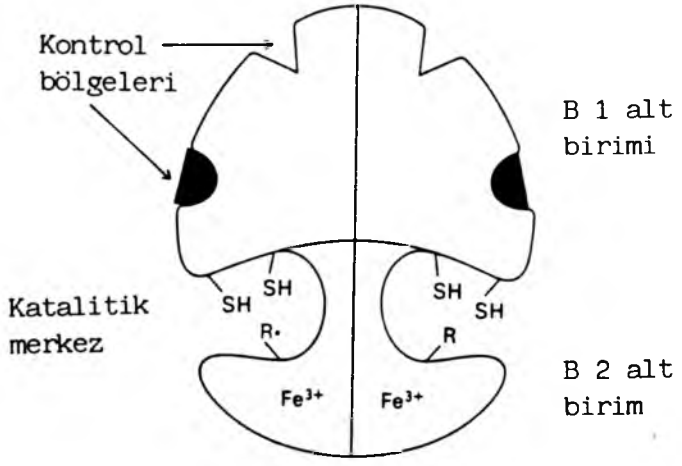
stokiyometrik denklemini şöyle yazabiliriz:

$$\text{Ribonükleosit difosfat} + \text{NADPH} + H^{+} \longrightarrow \text{Deoksiribonükleosit difosfat} + \text{NADP}^{+} + H_2O$$

Gerçek reaksiyon yukarıda görünenden daha karmaşıktır. Elektronlar NADPH'dan substrata bir seri sülfhidril grupları vasıtasıyla aktarılır. Substratın indirgenmesi olan son basamak reaksiyon ribonükleotid redüktaz tarafından katalizlenir. Bu reaksiyon şöyle gösterilebilir:

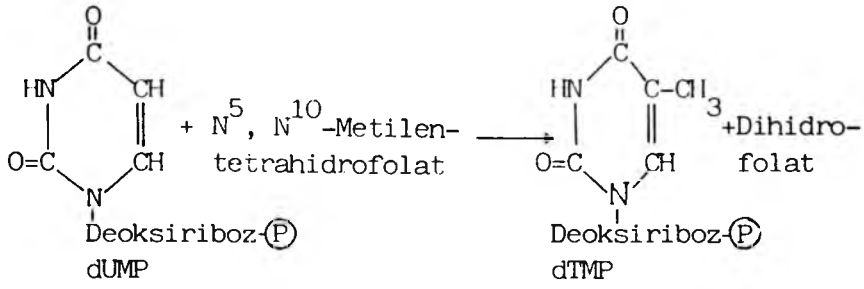


Bu enzim birisi 160 kdal'luk dimer (B1), diğeri de 79 kdal'luk dimer (B2) olmak üzere iki alt birimden ibarettir. B1 alt birimi ribonükleotid substratlar ve allosterik modülatörler için bağlanma bölgelerinin yanısıra, riboz biriminin indirgenmesinden önce elektron vericisi görevini yapan sülfhidrilleri de ihtiva ederler. Bir FeS proteni olan B2,B1 ile beraber kataliz görevini yerine getirirken, tirozin rezidüsünün aromatik halkasında oluşan serbest radikal grubuyla özel bir duruma sahiptir. Bu enzimi şöyle bir modelle gösterebiliriz:



Ribonükleotid redüktaz enzimi allosterik olarak kontrol edilir. dATP'nin bağlanması inhibisyona sebep olurken ATP'nin bağlanması da bu inhibisyonu azaltır.

DNA'da urasil yerine, onun metillenmiş analoğu timin yer alır. Fakat urasilin metillenmesi, deoksiribonükleosit monofosfat seviyesinde vukubulur. UMP, DNA'da kullanılmamasına rağmen deoksiriboza indirgenir, dUMP'ye çevrilir ve metillenerek **deoksitimidilata** (dTMP) dönüşür. Timidilat sentetaz tarafından katalizlenen bu reaksiyonda metil vericisi olarak N^5, N^{10} -metilentetrahidrofolat rol oynar. Takılan metil grubu, tetrahidrofolattaki metilen grubundan daha indirgenmiş olduğundan gerekli elektronlar tetrahidrofolatın kendisinden temin edilmektedir. Bir H^- (hidrür iyonu) vasıtasıyla halkadan ayrılan iki elektron ve H^+, dTMP'deki metil grubunun bir parçası olur ve geride tetrahidrofolatın yükseltgenmiş şekli olan dihidrofolat kalır.



Oluşan dihidrofolat, dihidrofolat redüktaz enziminin katalizlediği aşağıdaki reaksiyonla tekrar tetrahidrofolata çevrilir.

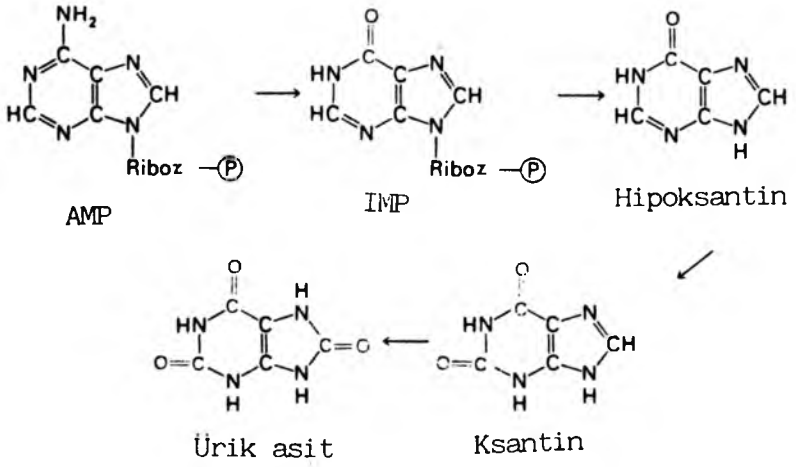
$$\text{Dihidrofolat} + \text{NADPH} + H^+ \longrightarrow \text{Tetrahidrofolat} + \text{NADP}^+$$

Hızlı çoğalan hücrelerin bol miktarda dTMP'ye ihtiyacı vardır. Bu nevi hücrelerden olan kanser hücrelerinin gelişmelerini önlemek üzere, kemoterapik özelliği olan ilaçlar kullanılmaktadır. Bu ilaçların bir kısmı timidilat sentetaz ve dihidrofolat redüktaz enzimlerinin inhibitörleridir.

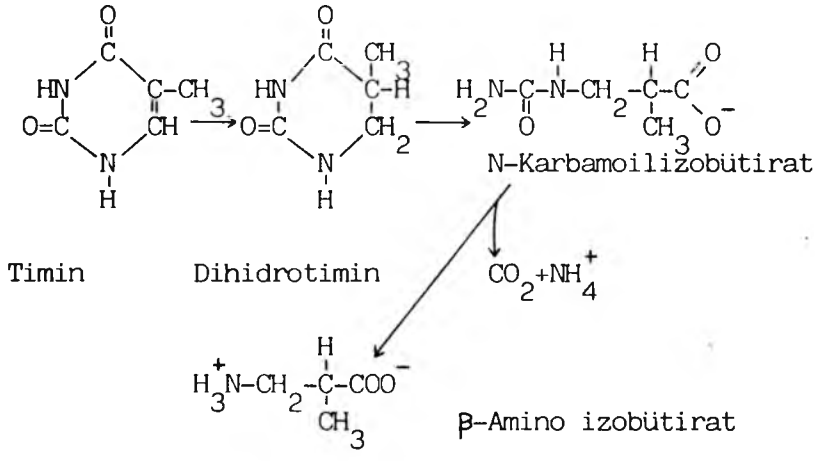
14.3. Pürin ve Pirimidin Yıkımı

Bir hücre nükleotidleri devamlı yıkım ve senteze maruz kalırlar. Nükleotidler önce nükleotidazlar tarafından nükleositlere hidrolizlenir. Daha sonra nükleosit fosforilazları nükleositleri serbest bazlara ve (deoksi) riboz 1-fosfata parçalar. Riboz 1-fosfat, fosforibomutaz enzimi vasıtasıyla PRPP sentezinin substratı olanı riboz 5-fosfata izomerize olur. Serbest bazların bir bölümü nükleotidleri teşkil etmek üzere tekrar kullanılır.

AMP'nin yıkımında ilâve bir basamak daha vardır. Önce AMP, adenilat deaminaz enzimi vasıtasıyla amino grubunu kaybederek IMP'ye dönüştürülür. Hipoksantin serbest bazının ortaya çıkmasına yol açan müteakip reaksiyonları yukarıda gördüğümüz nükleotid yıkımındakilerle aynıdır. Hipoksantin, bir Mo-Fe flavo proteini olan ksantin oksidaz enzimi tarafından önce ksantine, sonra da ürata (asit şekli ürik asit) oksitlenir. Her iki reaksiyonda da yükseltgeyici rolünü oynayan moleküler oksijen H_2O_2'ye indirgenir ve bu da katalaz enzimi tarafından H_2O ve O_2'ye parçalanır. Guaninden ürat teşekkülünde, yine ksantin ara bileşik olarak görev yapar. İnsanlarda ürat, pürin yıkımının son ürünü olup, idrarla atılır.



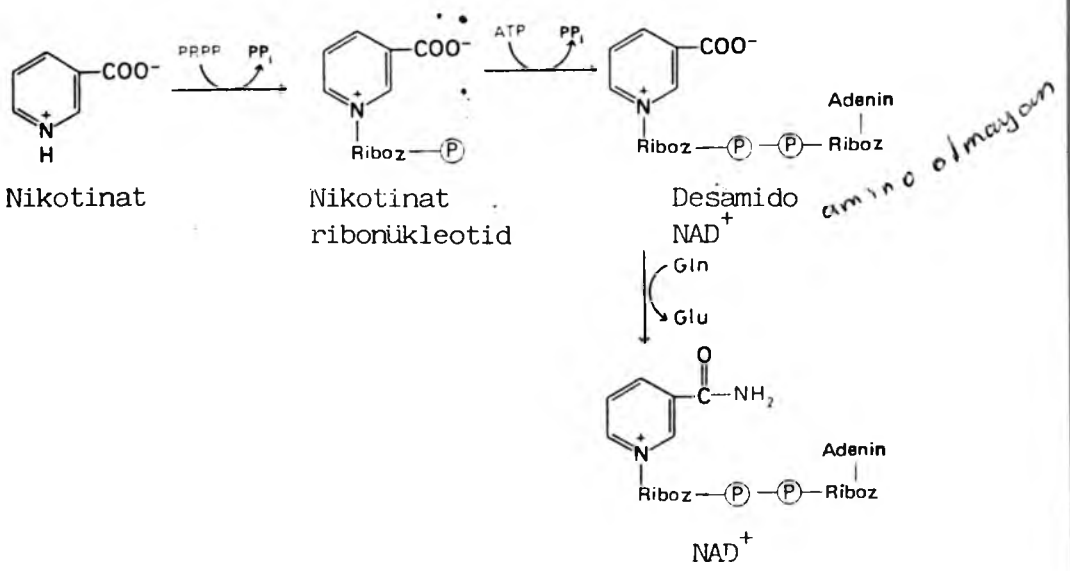
Pirimidin bazlarının yıkımına örnek olarak timinin akibetini inceleyeceğiz. Timin aşağıdaki reaksiyonlarda da gösterildiği gibi, β-aminoizobütirata kadar yıkılır. Bu bileşik de bir amino asit gibi metabolize olur. Önce transaminasyonla amino grubu uzaklaştırılarak metilmalonat semialdehid meydana gelir. Bu da daha önceden gördüğümüz reaksiyonlarla önce metil malonil CoA'ya ve oradan da sitrik asit devrine dahil olur.



14.4. NAD^+, FAD ve CoA'nın Sentezi

Bu önemli bileşiklerin üçünde de ATP başlangıç maddeleri olarak rol oynamaktadır.

NAD^+'nin sentezi nikotinat ve PRPP'den nikotinat ribonükleotidin teşekkülü ile başlar. Nikotinat (niasin de denilir) triptofandan türetilir. İnsanlar diyetlerinde yeterli triptofan aldıkları zaman gerekli miktarda nikotinat sentezleyebilirler. Daha sonra ATP'den AMP kısmı nikotinat ribonükleotide aktarılarak desamido-NAD^+ husule gelir. Son basamakta da glutaminin amid grubu nikotinatın karboksil grubuna transfer olarak NAD^+ meydana gelmiş olur. $NADP^+$ de NAD^+'nin 2'-hidroksil grubunun NAD^+ kinaz enzimi katalizörlüğünde fosforillenmesiyle teşekkül eder.



Nikotinat

Nikotinat ribonükleotid

Desamido NAD^+

amino olmayan

NAD^+

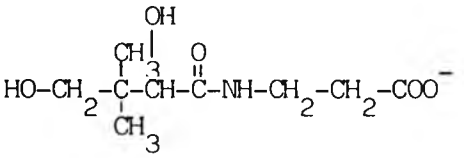
Flavin adenin dinükleotid (FAD), riboflavin ve iki molekül ATP'den sentezlenir. Önce riboflavin ATP tarafından fosforillenerek riboflavin 5'-fosfat (flavin mononükleotid, FMN) oluşturulur. Daha sonra ikinci bir ATP'nin AMP kısmının FMN'ye transferiyle FAD meydana gelir.

$$\text{Riboflavin} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{Riboflavin kinaz}} \text{FMN} + \text{ADP}$$

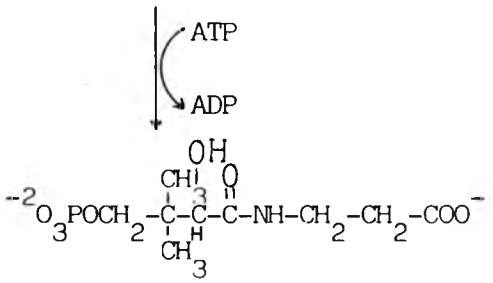
$$\text{FMN} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{FMN-Adenilil transferaz}} \text{FAD} + PP_i$$

Hayvanlarda **CoA'nın sentezi** pantotenatın fosforilasyonu ile başlar. Bu bileşik, bitkiler ve mikroorganizmalar tarafından sentezlenebildiği halde, hayvanlar tarafından diyetle alınması icabeder. Daha sonra 4-fosfopantotenatın karboksil grubu ile sisteinin amino grubu arasında bir peptid bağı oluşur. Sisteinin karboksil grubu da dekarboksilasyon reaksiyonu ile uzaklaştırılarak fosfopantotein teşekkül eder. Bundan sonra ATP'nin AMP kısmı

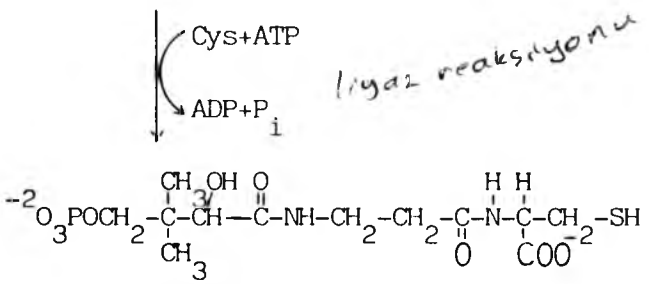
bu ara bileşiğe aktarılarak defosfokoenzim A oluşur. Son olarak da 3'-hidroksil grubunun fosforillenmesi ile koenzim A meydana gelir. Aşağıda pantotenattan CoA'nın biyosentez reaksiyonları özetlenmiştir.



Pantotenat

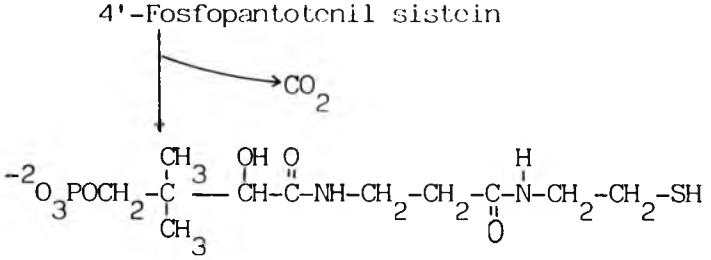


4'-Fosfopantotenat

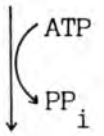


ligaz reaksiyonu

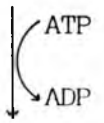
4'-Fosfopantotenil sistein



4'-Fosfopantetein



Defosfokoenzim A



Koenzim A (CoA)

NAD^+, FAD ve CoA biyosentezlerinin üçünde de müşterek bir motif göze çarpmaktadır: ATP'nin AMP kısmı, fosforillenmiş bir ara bileşiğin fosfat grubuna transfer olmaktadır. Burada oluşan pirofosfat da ortofosfata hidrolizlenir ve açığa çıkan enerji yukarıdaki reaksiyon dengesinin ürünler lehine büyük ölçüde kaymasına sebep olur.

15.BÖLÜM: METABOLİZMANIN BÜTÜNLÜĞÜ VE METABOLİK KOORDİNASYON

Bir canlı organizmanın ihtiyaçlarını karşılamak üzere metabolizma olaylarındaki çok karmaşık reaksiyon ağı nasıl koordine olmaktadır? Bu bölümde özellikle memelilerdeki metabolik bütünlüğün altında yatan bazı prensipleri gözden geçireceğiz. Konuya metabolizmanın temel stratejisini ve düzenlenme mekanizmalarını özet halinde tekrar gözden geçirmekle başlayacağız. Daha sonra glukoz 6-fosfat, piruvat ve asetil CoA'nın merkezi rollerini ve çeşitli organların metabolik farklılıklarını izah edeceğiz. Kan glukoz seviyesinin düzenlenme mekanizmasını izahdan sonra, uzun süreli açlığa karşı metabolik adaptasyonu da ele alacağız. Metabolizmanın bütünlüğü üzerinde önemli rollere sahip hormonların etki mekanizmaları son bölümde incelendiğinden burada anlatılmayacaktır.

15.1. METABOLİZMANIN GENEL STRATEJİSİ

Metabolizmanın temel hedefleri ATP, indirgeyici güç ve biyosentez için yapı taşları teşkil etmektir. Şimdi bunlardan önemli temaları kısaca tekrar gözden geçirelim:

1. ATP tüm canlılarda enerjinin geçer akçesidir. ATP'nin yüksek fosforil transfer etme potansiyeli, onun kas kasılması, aktif transport, sinyal amplifikasyonu ve biyosentez gibi enerji isteyen olaylarda enerji kaynağı olmasını sağlamıştır. Bir ATP molekülünün hidroliziyle açığa çıkan enerji bir reaksiyon dengesini 10^8 defa ürünler lehine çevirir. Böylelikle termodinamik yönden mümkün olmayan birçok reaksiyon yeterli sayıda ATP hidroliziyle çok kolay vuku bulur. Meselâ kolesterol sentezinde, mevalonatın aktifleşmiş beş karbonlu birim izopentenil pirofosfata çevrilmesinde üç ATP molekülü tüketilmektedir.

2. ATP, glukoz, yağ asitleri ve amino asitler gibi yakıt maddelerinin oksidasyonu ile üretilmektedir. Bu oksidasyonların çoğunda ortak ara bileşik asetil CoA'dır. Asetil birimi sitrik asit devrinde tamamen CO_2'ye yükseltgenerek NADH ve $FADH_2$'nin teşekkülünü sağlar. Bu elektron taşıyıcıları yüksek potansiyelli elektronlarını solunum zincirine aktarırlar. Bu elektronların O_2'ye akışları esnasında iç mitokondri zarından dışarıya protonlar pompalanır. Bu proton gradienti daha sonra ATP sentezinde kullanılır. Glikoliz yolu bir başka ATP üreten mekanizma olmasına rağmen sentezlenen ATP miktarı oksidatif fosforilasyona nisbeten çok düşüktür. Glukozun piruvata oksidasyonu ile 2 ATP sentezlenirken, 36 ATP glukozun tüm olarak H_2O ve CO_2'ye yükseltgenmesiyle yapılır. Bununla beraber anaerobik şartlarda ATP sentezi daha kısa bir sürede gerçekleşir. Çünkü oksidatif fosforilasyonda devamlı olarak O_2 sağlanması gerekir.

3. İndirgenmeli biyosentez olaylarında NADPH en önemli elektron vericisidir. Birçok biyosentezlerde ürünler genellikle başlangıç maddelerinden daha indirgenmiş halde olduklarından, ATP'nin yanısıra, NADPH'nın yüksek potansiyelli elektronlarını da gerektirirler. Meselâ, yağ asitleri sentezinde ilâve edilen iki karbonlu birimin keto grubu iki NADPH molekülünden sağlanan dört elektronla bir metilen grubuna indirgenir. Aynı şekilde monooksigenazlar hidroksilasyon reaksiyonlarında O_2'yi indirgemek için NADPH kullanırlar. İhtiyaç duyulan NADPH'ın büyük bir kısmı, pentoz fosfat yolu tarafından sentezlenir. Yağ asidi sentezi için mitokondriden sitozole asetil CoA'nın transferi esnasında malat enzimi tarafından da önemli miktarda NADPH üretilir.

4. Biyomoleküller nisbeten az sayıdaki yapı taşlarından yapılırlar. ATP ve NADPH üreten metabolik yollar aynı zamanda daha kompleks biyomoleküllerin sentezi maksadıyla yapı taşları da sentezlerler. Meselâ glikolizle meydana gelen dihidroksiaseton fosfat, fosfatidil kolin ve diğer fosfogliseridlerin gliserid omurgasını teşkil

eder. Bir başka glikoliz ara bileşiği olan fosfoenolpiruvat, aromatik amino asitlerin karbon iskeletlerinin bir kısmını oluşturur. Birçok yakıt bileşiklerinin yıkımında ortak bir ara bileşik olan asetil CoA, çok çeşitli biyosentez olaylarında iki karbonlu birim vericisi olarak rol oynar. Sitrik asit devrinde teşekkül eden süksinil CoA, porfirin sentezindeki ön maddelerden birisidir. Pentoz fosfat yolunda meydana gelen riboz 5-fosfat, nükleotidlerin şeker birimi kaynağıdır. Birçok biyosentezlerde ihtiyaç duyulan bir karbonlu birimler değişik oksidasyon seviyelerinde tetrahidrofolat tarafından sağlanır. Özet olarak, merkezi role haiz metabolizma yollarının katabolik rollerinin yanısıra, anabolik görevleri de vardır.

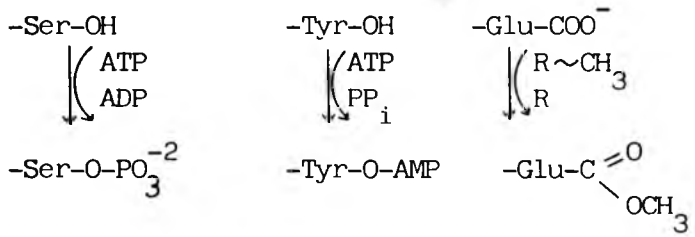
5. Biyosentez ve yıkım yolları genellikle birbirinden farklıdır. Meselâ, yağ asitlerinin sentez yolu yıkımından farklıdır. Aynı şey glikojen yolu için de geçerlidir. Bu ayrılık, yapım ve yıkım olaylarının her zaman termodinamik noktada olabilirliğini sağlamaktadır. Bir biyosentetik yol, yeterli sayıda ATP'nin hidrolizlenmesi beraberliğinde ekzergonik yapılabilir. Meselâ glukoneogenezle piruvatı glukoza çevirmek için, glikoliz yoluyla kazanılandan 4 fazla $\sim$P bağı tüketilmektedir. İşte bu dört ilâve $\sim$P, glukoneogezin de bütün hücre şartlarında glikoliz gibi yüksek derecede ekzergonik olmasını sağlar. Bir başka temel nokta da metabolik yolların hızlarının kütle etkisinden ziyade, enzim aktiviteleri tarafından kontrol edilmesidir. Yapım ve yıkım yollarının ayrı ayrı olması metabolik kontrolün müessiriyetini de arttırmaktadır.

15.2. GENEL METABOLİK KONTROL MEKANİZMALARI

Bir hücredeki kompleks reaksiyon ağı, en mükemmel şekilde regüle ve koordine edilmektedir. Evvelce biraz temas ettiğimiz metabolik kontrol mekanizmalarını tekrar gözden geçirelim:

1.Allosterik etkileşmeler: Metabolik yolların birçoğunda moleküllerin akışı, substratların elde edilebilirliğinden ziyade belirli enzimlerin miktar ve aktiviteleri tarafından tayin edilir. Dönüşümsüz reaksiyonlar güçlü kontrol noktalarıdır. Bir metabolik yoldaki ilk dönüşümsüz reaksiyon genellikle en önemli kontrol bölgesidir. Bu reaksiyonları katalizleyen enzimler allosterik olarak regüle edilirler. Örnek olarak glikolizde fosfofruktokinazı, yağ asidi sentezinde de asetil CoA karboksilazı verebiliriz. Allosterik etkileşmeler, bu enzimlerin farklı sinyalleri tesbit edip, bu bilgiyi bütünlemelerini mümkün kılmaktadır.

2. Kovalent modifikasyon: Bazı düzenleyici enzimler, allosterik etkileşmelerin yanısıra kovalent modifikasyonla da kontrol edilebilmektedir. Meselâ, fosforilasyon ile glikojen fosforilaz enziminin katalitik aktivitesi artarken, glikojen sentetazınki azaltılmaktadır. Bu kovalent modifikasyonlar spesifik enzimler tarafından gerçekleştirilir. Bir başka örnek olarak, bir AMP biriminin kovalent takılmasıyla glutamin sentetaz enzimi aktivitesinin düşmesini gösterebiliriz. Aşağıda dönüşümlü olarak bazı proteinlerin fosforilasyon, adenilasyon ve metilasyonla nasıl kovalent modifikasyona maruz kaldıkları gösterilmektedir.



Fosforilasyon Adenilasyon Metilasyon

Bu grupların koparılması ve takılması spesifik enzimler tarafından katalizlenmektedir. Acaba kovalent olmayan allosterik kontrolün yanısıra bir de kovalent modifikasyona ihtiyaç nereden doğmaktadır? Kilit mevkideki

enzimlerin kovalent modifikasyonu, metabolizmada amplifikasyonun son safhasını teşkil eder.

3.Enzim seviyeleri: Enzimlerin aktiviteleri gibi, miktarları da kontrol altındadır. Bazı düzenleyici enzimlerin sentez ve yıkım hızları hormonal faktörlere bağımlıdır.

4.Kompartımantasyon: Ökaryotik hücrelerin metabolik özellikleri, bu hücrelerde farklı kompartımanların mevcudiyetinden büyük oranda etkilenmektedir. Glikoliz, pentoz fosfat yolu ve yağ asidi sentezi sitozolde, yağ asidi oksidasyonu, TCA devri, oksidatif fosforilasyon ve keton cisimlerinin teşekkülü mitokondride vuku bulmaktadır. Glukoneogenez ve üre devri reaksiyonlarının bir bölümü mitokondride, bir bölümü de sitozolde cereyan etmektedir. Bazı moleküllerin akibetleri, onların sitozol veya mitokondride olmalarına göre değişir; bu yüzden bu moleküllerin iç mitokondri zarından geçişleri kontrol altındadır. Meselâ mitokondriye taşınan yağ asitleri hemen yıkılırken, sitozoldeki yağ asitleri esterleştirilir veya ihraç edilir. Uzun zincirli yağ asitlerinin karnitin ile ester yaparak mitokondri matriksine taşınması, bu tip moleküllerin geçişindeki membran kontrolüne bir örnektir.

5.Organların metabolik özelleşmesi: Yüksek ökaryotik canlılardaki düzenlenme mekanizması, farklı metabolik rolleri alan organların mevcudiyetinden son derece etkilenir. Bu bölümde kısaca organlar arası etkileşmeye de temas edeceğiz.

15.3. ÖNEMLİ BAZI METABOLİK YOLLARIN KONTROLÜ

1.Glikoliz: Sitozolde vuku bulan bu reaksiyon serisiyle glukoz, iki piruvat molekülüne çevrilirken, bu arada da iki ATP ve iki NADH meydana gelir. Gliseraldehid 3-fosfat dehidrogenaz enzimi tarafından katalizlenen reaksiyonda harcanan NAD^+'nın tekrar sağlanması gerekir. Çok aktif kas hücrelerinde olduğu gibi, anaerobik şart-

larda bu, piruvatın laktata indirgenmesiyle gerçekleştirilir. Aerobik şartlarda ise, NAD^+ rejenerasyonu, NADH'-dan elektronların solunum zinciri vasıtasıyla O_2'ye aktarılması sonucu meydana gelir. Glikoliz iki maksada hizmet eder: (1) ATP üretmek, (2) Biyosentez olaylarında kullanılmak üzere karbon iskeletleri sağlamak. Glukozun piruvata çevrilme hızı, bu çifte ihtiyacı karşılamak üzere düzenlenir. Glikolizde en önemli kontrol noktası, fosfofruktokinaz enzimidir. Yüksek ATP ve sitrat seviyeleri bu enzimi inhibe ederken, AMP de inhibisyonu azaltır. Özetle glikolizin hızı, ATP ve yapı taşlarına olan ihtiyaca bağımlı olup, bu ihtiyaçlar ATP/AMP oranı ve sitrat konsantrasyonu tarafından belirlenir.

2.TCA devri: Karbohidratların, amino asitlerin ve yağ asitlerinin oksidasyonunda son kavşak noktası olan TCA devri, mitokondri içinde cereyan eder. Şekerler ve yağlar siklüse asetil CoA halinde girerlerken, bazı amino asitlerin karbon iskeleti TCA devrinin başka ara bileşikleriyle dahil olurlar. Bir asetil biriminin tam oksidasyonu sonucu bir GTP, üç NADH ve bir $FADH_2$ oluşur. Bu elektron taşıyıcıları solunum zinciri aracılığı ile elektronlarını O_2'ye aktarırken aynı anda da ADP, ATP'ye fosforillenir. Solunum kontrolü adı verilen bu sıkı bağlantı ile, sitrik asit devri hızının ATP ihtiyacını karşılaması temin edilir. ATP bol olduğu zaman sitrat sentetaz, izositrat dehidrogenaz ve α-ketoglutarat dehidrogenaz enzimlerinin aktiviteleri azalır. Sitrik asit devrinin anabolik rolü de vardır. Bu devrin bazı ara bileşikleri, amino asitler ve porfirinlerin sentezinde kullanılır.

3.Pentoz fosfat yolu: Sitozolde cereyan eden bu reaksiyon serisi iki amaca yöneliktir:(1) Biyosentez olaylarında kullanılmak üzere NADPH'ın sentezi, (2) Nükleotid sentezinde kullanılmak üzere riboz 5-fosfatın yapımı. Glukoz 6-fosfatın riboz 5-fosfata çevrilmesi esnasında iki adet NADPH üretilir. Glukoz 6-fosfatın dehidrogenasyonu bu yoldaki kontrol noktasıdır. Bu reaksiyonu katalizleyen enzimin aktivitesi $NADP^+$ seviyesiyle yakın-

dan alakalıdır. NADPH'deki fazladan bulunan fosforil grubu, bu bileşiği NADH'dan ayıran işaret olup, bu sayede aynı hücre kompartımanında yüksek $NADPH/NADP^+$ ve $NAD^+/NADH$ oranları birarada olabilmektedir. Bunun neticesi olarak da biyosentez ve glikoliz aynı anda yüksek bir hızda cereyan edebilir.

4.Glukoneogenez: Glukoz, karaciğer ve böbrekler tarafından karbohidrat yapısında olmayan laktat, gliserol ve amino asitler gibi başlangıç maddelerinden sentezlenebilir. Bu yolun en önemli giriş noktası piruvattır. Piruvat mitokondride karboksilasyonla okzalasetata çevrilir. Okzalasetat da sitozole geçerek burada dekarboksilasyon ve fosforilasyonla fosfoenolpiruvata çevrilir. Her iki yol biribirinin tersine bir düzenlenmeye maruz kaldıklarından birisi tam aktif iken, diğeri inaktiftir. Meselâ fruktoz 1,6-difosfat enzimi AMP tarafından inhibe, sitrat tarafından aktive edilirken, bu iki molekül fosfofruktokinaz üzerinde zıt etki sergilerler.

5.Glikojen sentezi ve yıkımı: Glikojen sentezindeki aktifleştirilmiş ara bileşik UTP ve glukoz 1-fosfattan meydana gelen UDP-glukozdur. Uzayan bir zincirin uç hidroksil grubuna UDP-glukozdan glukoz birimi, glikojen sentetaz enzimi katalizörlüğünde eklenir. Glikojen yıkımı farklı bir yolla olur. Glikojenin bir ortofosfat beraberliğinde glukoz 1-fosfata parçalanması reaksiyonu, fosforilaz enzimi tarafından katalizlenir. Glikojen sentez ve yıkımı hormonal yoldan düzenlenir ve sentetaz aktif iken, fosforilaz inaktiftir veya bunun tersidir. Bu enzimler fosforilasyonla ve kovalent olmayan allosterik etkileşmelerle düzenlenirler.

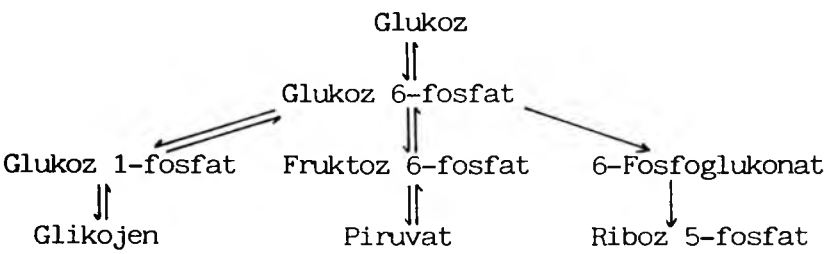
6.Yağ asidi sentez ve yıkımı: Yağ asitleri sitozolde, açil taşıyıcı proteine bağlı olarak uzayan zincire iki karbonlu birimlerin eklenmesiyle sentezlenir. Bu birimlerin vericisi olan malonil CoA, asetil CoA'nın karboksilasyonu ile teşekkül eder. Asetil grupları mitokond-

riden sitozole sitrat vasıtası ile taşınır. Bu mekik geçişi esnasında, eklenen asetilin indirgenmesinde kullanılacak NADPH'ın büyük bir kısmı sentezlenir, geride kalanı pentoz fosfat yolu tarafından sağlanır. ATP ve asetil CoA bol olduğu zaman sitrat seviyesi artar. Yüksek sitrat seviyesi yağ asidi sentezinde, en önemli düzenleyici enzim olan asetil CoA karboksilaz enzimini aktive eder. Bu enzim yine feed-back mekanizması ile sentez ürünü palmitoil CoA'nın yüksek seviyesinde inhibe edilir. Yağ asitleri farklı bir yol ile mitokondri matriksinde β-oksidasyonuyla asetil CoA birimlerine yıkılır. Asetil CoA sitrik asit devrine, β-oksidasyon esnasında oluşan $FADH_2$ ve NADH elektron taşıyıcıları da elektronlarının O_2'e aktarılması amacıyla solunum zincirine dahil olurlar. Aynen TCA devrinde olduğu gibi, β-oksidasyon da NAD^+ ve FAD'nin rejenerasyonu ile devam edebilir. Yani yağ asitlerinin yıkım hızı da ATP'ye duyulan ihtiyaç tarafından tayin edilir.

15.4. METABOLİZMANIN KAVŞAK NOKTALARINI TEŞKİL EDEN BİLEŞİKLER

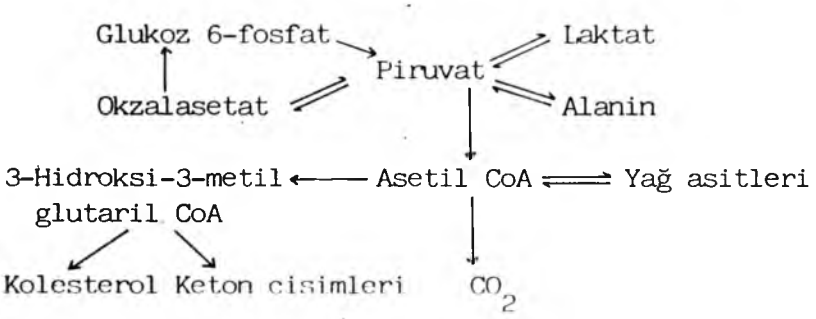
Metabolizma olaylarında moleküllerin akışını yöneten faktörleri daha iyi kavramak için, kavşak noktalarında yer alan kilit bileşiklerin, yani glukoz 6-fosfat, piruvat ve asetil CoA'nın akibetlerini incelemek icabeder. Şimdi bunları tek tek ele alalım.

1. Glukoz 6-fosfat: Bir hücreye dahil olan glukozun tek bir akibeti vardır; glukoz 6-fosfata çevrilmek. Glukoz 6-fosfat da aşağıdaki şemada gösterilen akibetlere uğrar:



Glukoz 6-fosfat ve ATP bol olduğu zaman glikojen teşekkül eder. ATP'ye veya biyosentez için karbon iskeletine ihtiyaç olduğu durumda glukoz 6-fosfat glikoliz ile yıkılır. Böylece glikolizin katabolik olduğu kadar anabolik rolü de görünmektedir. Glukoz 6-fosfatın üçüncü önemli akibeti, pentoz fosfat yoluna dahil olmasıdır. Bildiğimiz gibi bu yol NADPH ve riboz 5-fosfat üretmekteydi. Daha önceden bu yolun NADPH, riboz 5-fosfat ve ATP ihtiyacına göre işleyen ne kadar esnek bir reaksiyon serisine sahip olduğunu görmüştük. Glukoz 6-fosfat, glikojenin mobilizasyonu ile veya glukoneogenezle oluşabilir. İleride de izah edileceği gibi, kandaki düşük glukoz seviyesi karaciğer ve böbrekte hem glikojenolizi hem de glukoneogenezi stimüle eder. Bu organlarda glukozun kana salıverilmesini mümkün kılan glukoz 6-fosfataz enzimi mevcuttur.

2.Piruvat: Bir başka önemli kavşak bileşiği olan bu üç karbonlu α-keto asidin akibeti,yine başka bir metabolik kavşakta yer alan asetil COA'nın akıbeti ile beraber aşağıdaki şemada gösterilmiştir.



Piruvat başlıca glukoz 6-fosfat, laktat ve alaninden türetilir. Laktat piruvatın indirgenmiş şeklidir. Bu indirgenme anaerobik şartlarda glikolizin devam edebilmesi maksadıyla gerekli olan NAD^+'nin rejenerasyonunu da sağlayan laktat dehidrogenaz enzimi tarafından katalizlenir. Aktif dokularda hasıl olan laktat, çoğunluğu karaciğerde olmak üzere piruvata geri oksitlenir. Bu birbirine çevrilmenin temelinde, zaman kazanmak ve aktif kasın me-

tabolik yükünün bir bölümünü karaciğere kaydırmak yatmaktadır. Piruvat, sitozolde dönüşebilir bir transaminasyon reaksiyonu ile alanine çevrilebilir. Bazı amino asitler de bu şekilde merkezi metabolik yollara girerler. Bunun tersi de vuku bulabilir ve bazı amino asitler karbohidrat başlangıç maddelerinden sentezlenebilir. Yani transaminasyon amino asit ve karbohidrat metabolizmaları arasında bir bağlantı oluşturmaktadır. Piruvatın bir üçüncü akibeti de mitokondri içinde karboksilasyon ile okzalasetata çevrilmesidir. Bu reaksiyon hem glukoneogenez için lüzumlu, hem de sitrik asit devri ara bileşiklerinde ortaya çıkabilecek eksikliklerin tamamlanması için gereklidir. Piruvat karboksilaz enzimi, artan asetil CoA seviyesi tarafından aktifleştirilerek, daha önceden okzalasetat azlığından yavaşlamış bulunan TCA devrini hızlandırır. Diğer taraftan ATP bol olduğu zaman TCA devri inhibe edilir ve piruvat karboksilaz tarafından sentezlenen okzalasetat da bu durumda glukoneogenez yoluna girer. Piruvatın dördüncü önemli akibeti oksidatif dekarboksilasyonla asetil CoA'ya çevrilmesidir. Bu dönüşümsüz reaksiyonla, şekerlerin ve amino asitlerin karbon atomları, ya sitrik asit devrinde oksitlenir veya lipid biyosentezinde kullanılır. Piruvatın oksidatif dekarboksilasyonunu katalizleyenen piruvat dehidrogenaz multienzim kompleksinin aktivitesi birçok allosterik etkileşmeler ve kovalent modifikasyonlarla düzenlenir.

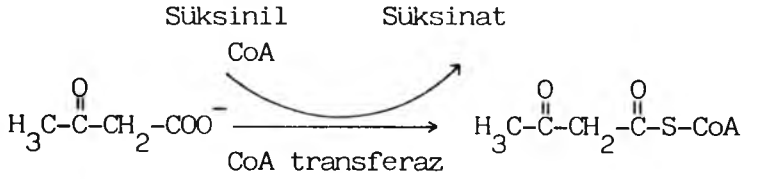
3.Asetil CoA: Bu aktifleşmiş iki karbonlu birimin başlıca kaynakları piruvatın oksidatif dekarboksilasyonu ve yağ asitlerinin β-oksidasyonudur. Ayrıca ketogenik amino asitlerden de türetilir. Asetil CoA'nın akibeti, metabolizmadaki birçok molekülün aksine çok sınırlıdır. Ya TCA devrinde okside olur veya üç molekül asetil CoA' dan 3-hidroksi-3-metil-glutaril CoA'yı oluşturarak, bu altı karbonlu ara bileşikten keton cisimlerinin veya kolesterolün sentezine meydan verilir. Asetil CoA'nın üçüncü akibeti de sitrata çevrilerek mitokondriden sitozole geçip, yağ asidi sentezinde kullanılmasıdır. Memelilerde asetil CoA'nın tekrar piruvata dönüştürülmesi mümkün de-

ğildir. Bunun sonucu olarak da memeliler lipidleri karbohidratlara çeviremezler.

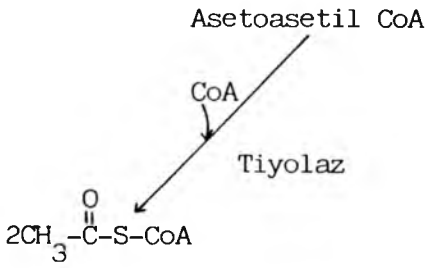
15.5. BAZI ORGANLARIN METABOLİK ÖZELLİKLERİ

Beyin, kas ve yağ dokularıyla karaciğerin metabolik özellikleri birbirinden oldukça farklıdır. Şimdi bu organların enerji ihtiyaçlarını karşılamak üzere yakıt maddelerini kullanmadaki farklılıkları ele alalım.

1. Beyin: Uzun süreli açlık haricinde beyinin tek yakıt maddesi glukozdur. Beyinde yakıt depoları bulunmadığından glukozun devamlı olarak sağlanması gerekir. Bir erişkin beyni günde 420 kcal'lik bir enerjiye tekabül eden 120 g glukoz tüketir. İstirahat halindeki bir insan vücudu tarafından tüketilen glukozun % 60'ı beyin tarafından kullanılır. Açlık esnasında keton cisimleri glukozun yerini alır. Asetoasetat aşağıdaki reaksiyonlarla 2 asetil CoA'ya çevrilir.



Asetoasetat



Asetil CoA

Asetil CoA'lar da sitrik asit devrine girerek beyin için gerekli ATP moleküllerinin sentezini netice verir-

ler. Yağ asitleri beyinde yakıt olarak kullanılamazlar, çünkü bu moleküller albümine bağlı olduklarından kan-beyin engelini aşamazlar. Aslında keton cisimleri yağ asitlerinin transport edilebilir eşdeğerleri olarak düşünülebilir. İleride de kısaca izah edileceği gibi, yakıt olarak glukozdan keton cisimlerine bir kaymanın olması, açlık esnasında protein yıkımını minimuma indirir.

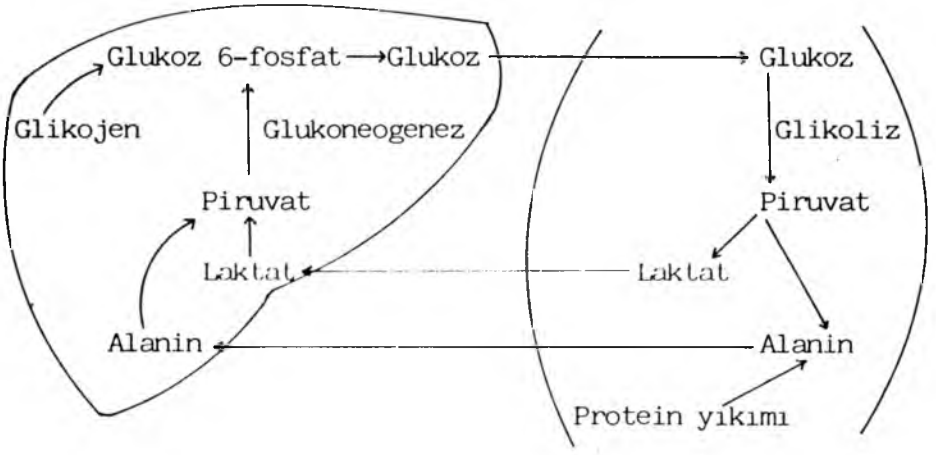
2. Kaslar: Kasların istifade edebildiği başlıca yakıt maddeleri glukoz, yağ asitleri ve keton cisimleridir. Beyinden farklı olarak büyük miktarda glikojen depoları vardır (1200 kcal). Bütün vücuttaki glikojenin yaklaşık 2/3'ü kaslarda bulunur (Tablo 15.1). Bir öğün yemek sonrası kastaki glikojen oranı % 1'e kadar yükselir. Bu glikojen kolayca kas hücresi içinde glukoz 6-fosfata çevrilir. Kaslar da beyin gibi, glukoz 6-fosfataz ihtiva etmedikleri için glukoz salıvermezler, bilakis ani aktiviteleri için glukozu tercihan kullanırlar. Aktif olarak ka-

Tablo 15.1. 70 kg'lık normal bir insandaki yakıt madde rezervleri (kcal cinsinden).

Organ	Glukoz veya glikojen	Triaçilgliseroller	Mobilize edilebilen proteinler
Kan	60	45	0
Karaciğer	400	450	400
Beyin	8	0	0
Kas	1.200	450	24.000
Yağ dokusu	80	135.000	40

sılan kaslarda, glikoliz hızı sitrik asit devri hızından kat kat fazla olur. Bu şartlar altında teşekkül eden piruvatın büyük bir kısmı laktata indirgenerek kan vasıtasıyla karaciğere taşınır ve orada glukoza çevrilir. Cori

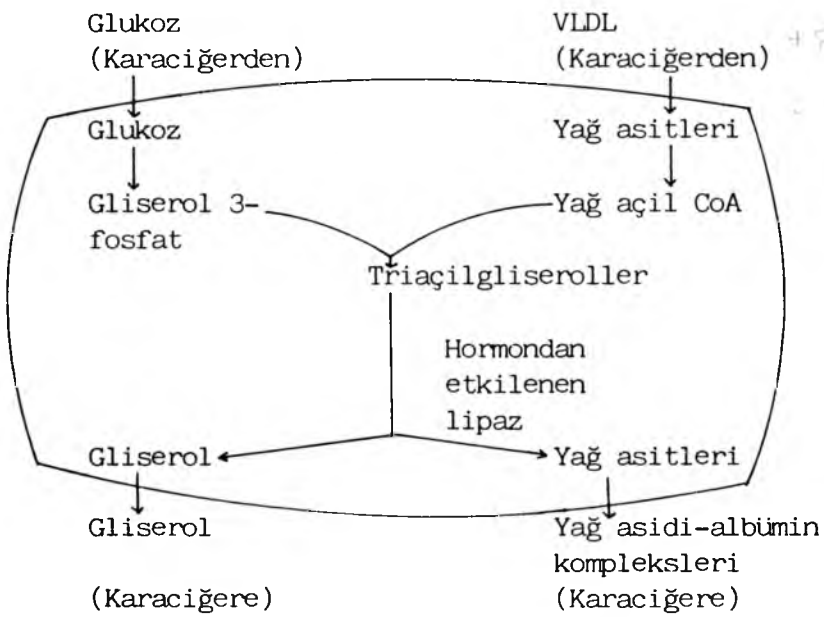
devri olarak da anılan bu dönüşümler sayesinde kasların üzerindeki metabolik yükün bir bölümü karaciğere kaydırılmış olur. Ayrıca piruvatın transaminasyonu ile aktif kas hücrelerinde yüksek oranda alanin teşekkül eder. Alanin de aynen laktat gibi karaciğer tarafından glukoza çevrilebilir (Şekil 15.1). İstirahat halindeki kasların metabolik özellikleri oldukça farklıdır. Bu durumda en önemli yakıt maddesi yağ asitleridir. Keton cisimleri kalp kasları için de yakıt vazifesi görebilir. Gerçekten kalp kası hücreleri asetoasetatı glukoza tercihan kullanırlar.



Şekil 15.1. Kaslar ve karaciğer arasındaki metabolik değişimler.

3. Yağ dokusu: Yağ dokusunda depolanmış bulunan triaçilgliseroller, son derece büyük bir metabolik yakıt stoklarıdır. Bunların 70 kg'lık bir kişideki enerji karşılığı 135.000 kcal'yi bulur. Adipoz doku, yağ asitlerinin esterifikasyonu ve triaçilgliserollerden hidrolizi için özelleşmiş hücreleri ihtiva eder. İnsanda yağ asitlerinin sentezlendiği en başta gelen yer karaciğerdir. Bu durumda adipoz dokunun en önemli biyosentetik görevi, bu yağ asitlerini CoA türevlerine çevirerek aktifleştirmek ve bunları gliserole aktarmaktır. Bahsi geçen sentez reaksiyonunda kullanılan gliserol 3-fosfat, bir glikoliz ara bileşiği olan dihidroksiaseton fosfatın indirgenme-

siyle elde edilir. Yağ hücreleri, iç kaynaklı gliserolü fosforilleyemezler, çünkü kinaz enzimine sahip değillerdir. Özetlersek, adipoz hücreler triaçillerin sentezi için glukoza ihtiyaç duyarlar. Triaçilgliseroller, lipaz enzimleri katalizörlüğünde yağ asitlerine ve gliserole hidrolizlenir. Bir trigliseridden ilk yağ asidinin hidrolizi, hızı sınırlayıcı reaksiyon olup, dönüşümlü olarak fosforillenebilen ve hormonal etkiye hassas bir lipaz enzimi tarafından katalizlenir. Glikojen metabolizmasında olduğu gibi burada da cAMP hormon etkisini amplifiye eden aracı bileşiktir. Adipoz hücrelerdeki triaçilgliseroller devamlı olarak hidrolizlenip tekrar sentezlenirler. Hidroliz esnasında açığa çıkan gliserol, karaciğere taşınır (Şekil 15.2). Oluşan yağ asitleri ise, eğer ortamda bol miktarda gliserol 3-fosfat mevcutsa tekrar esterleşir. Aksi halde plazmaya salıverilir. Böylece adipoz hücre içindeki glukoz seviyesi, yağ asitlerinin kana salınıp salınmamasını tayin eden en önemli faktör olmaktadır.



Şekil 15.2. Adipoz dokuda triaçilgliserollerin sentez ile yıkımı ve karaciğerle alışverişi.

4. Karaciğer: Bu organın metabolik faaliyetleri beyin, kas ve diğer periferal dokuların yakıt ihtiyacını sağlamada hayati öneme haizdir. Bağırsaklar tarafından absorbe edilen bileşiklerin çoğu önce karaciğerden geçerler, çünkü bu organ birçok metabolitlerin kandaki seviyesini düzenleyebilmektedir. Karaciğer, yaklaşık 400 kcal eşdeğerinde glukozu, glikojen halinde depolayabilir. Gerektiğinde, yine glikojeni parçalayarak veya glukoneogenezle kana glukoz sağlar. Glukoz karaciğerde başlıca, kasdan gelen laktat ve alaninden, adipoz dokudan gelen gliserolden ve diyetle alınan glukogenik amino asitlerden çıkarak sentezlenir. Lipid metabolizmasının düzenlenmesinde de karaciğer en önemli role sahiptir. Yakıt bileşiklerinin bol olduğu durumda karaciğerde yağ asitleri sentezlenir, esterleştirilir ve çok düşük dansiteli lipoproteinler (VLDL) halinde kana salgılanır. Bu plazma lipoproteini adipoz dokuda sentezlenen triaçilgliserollerin en önemli kaynağıdır. Bununla beraber açlık durumunda yağ asitleri karaciğerde keton cisimlerine çevrilir. Acaba karaciğer birbirinin zıddı olan bu iki yol arasında nasıl seçim yapmaktadır? Bu seçim yağ asidinin mitokondri matriksine girip girmemesine bağlıdır. Hatırlıyacağımız gibi, uzun zincirli yağ asitleri iç mitokondri zarını karnitinle esterleşerek aşmaktaydı. Bu membranın dış tarafında açil karnitinin oluşumunu katalizleyen enzim, yağ asitleri sentezindeki önemli ara bileşik malonil CoA tarafından inhibe edilir. Böylece uzun zincirli yağ asitleri sentezlendiği zaman, bunların β-oksidasyona ve keton cisimleri yapımına uğradığı mitokondri matriksine girmeleri önlenmekte ve triaçilgliserollerle fosfolipidlere çevrilmeleri sağlanmaktadır.

Yakıt bileşiklerinin az olduğu açlık durumunda, malonil CoA seviyesi düşer ve bunun sonucu olarak da yağ dokusundan yağ asitleri salınır. Bunlar da mitokondri matriksine girerek keton cisimlerine dönüştürilür. Peki karaciğer kendi enerji ihtiyacını nasıl karşılamaktadır? Karaciğer yakıt olarak amino asitlerin yıkımından ortaya çıkan keto asitleri glukoza tercih eder. Gerçekten, kara-

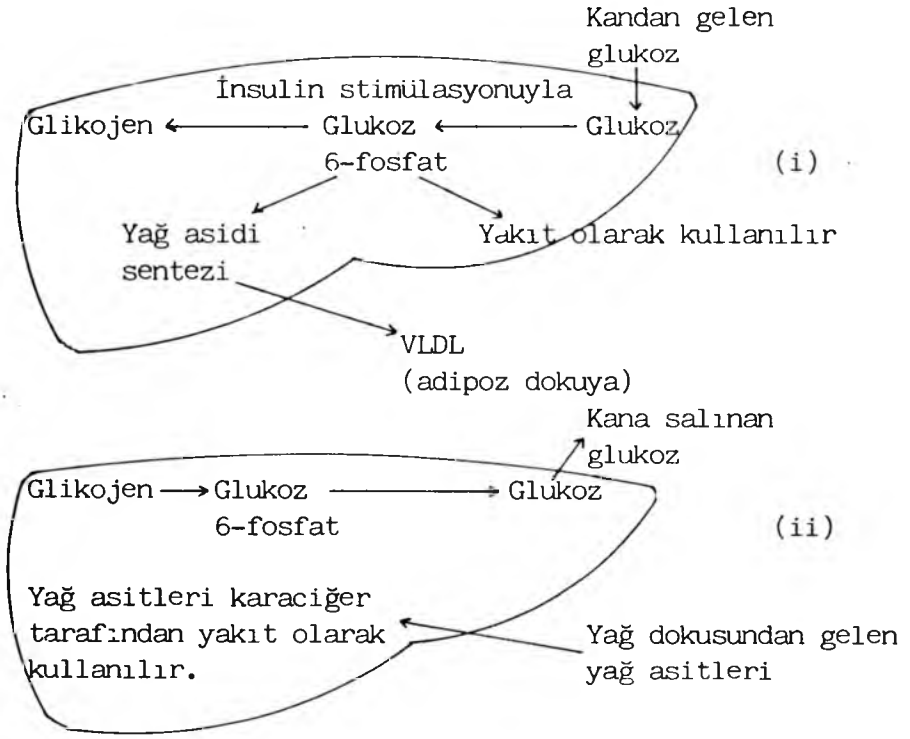
ciğerdeki glikolizin başlıca hedefi biyosentez için yapı taşları oluşturmaktır. Karaciğer asetoasetattan da istifade edemez, çünkü bu bileşiği asetil CoA'ya çeviren transferaz enziminden yoksundur. Görüldüğü gibi karaciğer, kaslar ve beyin için hazırladığı besinleri kendisi kullanmamakta ve fedakâr bir anne gibi davranmaktadır.

15.6. KAN GLUKOZ SEVİYESİNİN KARACİĞER TARAFINDAN DENETİMİ

Normal bir kişinin bir gecelik açlık sonrası kan glukoz seviyesi 80mg/100 ml (4,4 mM) civarındadır. Bu seviye, yemek öncesi 80 mg/100 ml'den yemek sonrası 120 mg/100 ml arasında gün boyu değişir. Görüldüğü gibi, glukozun alım ve kullanımında çok büyük değişmelere rağmen, kan glukoz seviyesi nisbeten sabit kalmaktadır. Hormonların etkisi haricinde glukoz metabolizmasına etki eden faktörleri ve bu metabolizmanın ayrıntılarını görmüştük. Şimdi hormonların etkisini de nazara olarak (bak 18. bölüm) kan glukozunun sabit seviyede tutulması olayının nasıl gerçekleştiğini inceleyelim:

Kan glukoz seviyesi başlıca hormonal sinyallere ve glukozun kandaki seviyesine göre, glukozu alıp ve kana salgılayabilen bir organ olan karaciğer tarafından düzenlenir (Şekil 15.3). Karbohidratlı bir yemekten sonra kanda glukoz seviyesinin artması karaciğerde glukoz 6-fosfatın yükselmesine yol açar, çünkü bu glukoz konsantrasyonunda hekzokinazın yanısıra glukokinaz da katalizlemeye katılır. Hatırlanacağı gibi, glukokinaz hekzokinaza nisbeten glukoz için daha yüksek K_M değerine sahiptir($\sim$10 mM) ve glukoz 6-fosfat tarafından inhibe edilmez. Bunun sonucu olarak da, kan glukoz seviyesi yükseldiği zaman, karaciğerde glukoz 6-fosfat daha hızlı olarak sentezlenmeğe başlar. Glukoz 6-fosfatın bundan sonraki akibeti büyük oranda glukagon ve insulinin zıt etkileri tarafından denetlenir. Yüksek kan glukoz seviyesi pankreastan glukagon salgılanmasını azaltırken, insulin sekresyonunu artırır. Bunun sonucu olarak glikojen sentezi, kan glukoz seviyesi yükseldiği zaman hızla artar. Glikojen sentez ve depolanması üzerindeki hormonal etki glukozun bizzat ken-

disi tarafından da kuvvetlendirilir. Çünkü glukoz seviyesi yüksek olduğu zaman, glukoz fosforilaz a'ya (glikojen fosforilazın aktif şekli) bağlanarak onu fosfataz enzimi tarafından daha kolay etkilenebilir bir konformasyona getirir. Fosfataz enzimi de fosforilaz a'daki fosfat bağını parçalayarak inaktif şekli olan fosforilaz b'ye çevirir. Aynı fosfataz glikojen sentetazı da defosforile ederek aktifleştirir. Böylece glukoz bir allosterik modülatör olarak glikojen sisteminin faaliyetini yıkımdan sentez şekline sokar.



Şekil 15.3. Kan glukoz seviyesinin karaciğer tarafından kontrolü:(i) Yemekten sonra, (ii) Bir gece açlık sonrası.

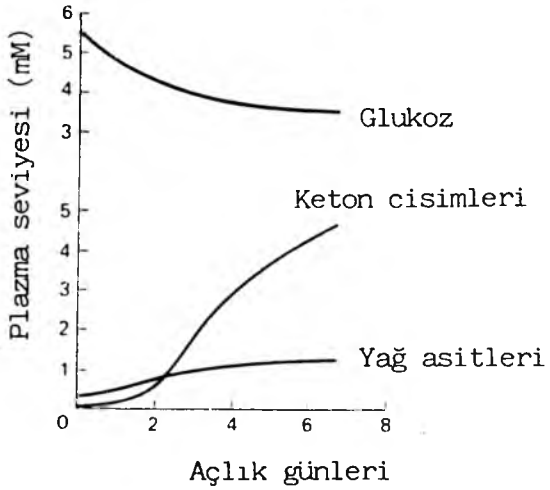
Yüksek insulin seviyesi, glukozun kas ve adipoz dokusuna girişini teşvik eder. Kasta da, karaciğerde olduğu gibi, glikojen sentezi insulin tarafından stimüle edilir.

Kan glukoz seviyesi yemekten birkaç saat sonra düşmeye başlar ve bunun sonucu olarak da insulin salgılanması azalırken, glukagon salgılanması artar; cAMP aracılığı ile hızlı bir glikojen parçalanması başlar. Glukoz 6-fosfatın parçalanmasıyla karaciğerden kana glukoz salınır. Kaslar ve adipoz doku tarafından glukoz kullanımı azaldığından, kan glukoz seviyesi nisbeten muhafaza edilir. Kaslar ve karaciğerin her ikisi de, bu durumda yakıt olarak yağ asitlerini kullanır. Özetlersek, açlık durumunda kan glukoz seviyesinin 80 mg/100 ml üzerinde tutulmasında başlıca üç faktör rol oynar: (1) Karaciğerde glikojen mobilizasyonu ve kana glukoz salınması, (2) Yağ dokusu tarafından yağ asitlerinin salınması, (3) Kaslar ve karaciğer tarafından yakıt kullanımının glukozdan yağ asitlerine çevrilmesi.

15.7. UZUN SÜRELİ AÇLIK DURUMUNDA METABOLİK ADAPTASYON

Tablo 15.1'de gösterildiği gibi, 70 kg'lık normal bir kişinin açlık öncesi yakıt depolarında enerji eşdeğeri olarak 1600 kcal'lik glikojen, 24.000 kcal'lik mobilize edilebilir protein ve 135000 kcal'lik triaçilgliseroller bulunmaktadır. 24 saatte enerji ihtiyacı aktiviteye bağlı olarak 1600 kcal ile 6000 kcal arasında değişir. Bu durumda açlıkta bir ila üç ay süre ile kalori ihtiyacını karşılayacak depolanmış yakıt mevcuttur. Bununla beraber karbohidrat rezervleri yalnız bir günde tüketilir. Bu şartlar altında bile kan glukoz seviyesi 50 mg/100 ml olarak muhafaza edilir. Beyin çok kısa süre de olsa bundan daha düşük glukoz seviyesine müsamahalı değildir. Bu durumda açlık halinde metabolizmanın öncelikle sağlamak mecburiyetinde olduğu şey, yakıt kaynağı olarak tamamen glukoza bağımlı olan beyin ve alyuvarlar gibi dokulara yeterli glukozu eriştirmektir. Ancak glukoz yapılacak ön maddeler bol değildir. Enerjinin çoğu yağlar halinde depolanmıştır. Hatırlanacağı gibi, memelilerde yağ asitleri glukoza dönüştürülemiyordu. Triaçilgliserollerin gliserol kısmı, glukoza dönüşebilmesine rağmen, sınırlı miktardadır. Glukozun tek diğer kaynağı, proteinlerin yıkımıyla

ortaya çıkan amino asitlerdir. Açlık halinde amino asitlerin en önemli kaynağı kaslardır. Bununla beraber aç bir kimsenin yiyecek bulması için hareket etmesi gerekir. Bu da bir kas kütlesinin mevcudiyetini gerektirir. Öyleyse metabolizmanın ikinci öncelikli görevi protein miktarını muhafaza etmektir. Bu da yakıt kaynağını glukozdan yağ asitlerine ve keton cisimlerine kaydırmakla mümkün olur(Şekil 15.4).



Şekil 15.4. Açlık halinde yağ asitleri ve keton cisimlerinin plazma seviyeleri artarken glukozunki azalır.

Açlığın ilk günü metabolik değişmeler bir gecelik açlık ile aynıdır. Düşük kan glukoz seviyesi insulin salgılanmasının azalmasına glukagon sekresyonunun artmasına yol açar. Önde gelen metabolik olaylar, yağ deposunda triaçilgliserollerin mobilizasyonu ve karaciğerdeki glukoneogenezdir. Karaciğer kendi ihtiyaçlarını adipoz dokudan salınan yağ asitlerini oksitleyerek sağlar. Sonuç olarak, asetil CoA ve sitrat artar ve glikoliz durur. İnsulin seviyesinin düşmesinden dolayı kasın glukoz alımı azalırken, yağ asitleri serbestçe girer. Karaciğer gibi kaslar da yakıt kaynağı olarak glukozdan yağ asitlerine kayar. Kas tarafından yağ asitlerinin β-oksidasyonu, piruvatın asetil CoA'ya çevrilmesini durdurur. Bunun sonucu

olarak, piruvat, laktat ve alanin glukoza çevrilmek üzere karaciğere taşınır. Kas proteinlerinin de parçalanması glukozun bu ön maddelerinin bir bölümünü karşılar. Triaçilgliserollerin lipolizi ile ortaya çıkan gliserol de glukoz yapımı için bir başka kaynak oluşturur.

Açlığın üçüncü gününden sonra, karaciğer tarafından büyük miktarda asetoasetat ve 3-hidroksibütirat keton cisimleri sentezlenir. Bu bileşiklerin asetil CoA'dan yapımları, sitrik asit devrinin yağ asitleri oksidasyonu ile ortaya çıkan asetil birimlerinin tamamını oksitleyememesinden dolayı önemli miktarda artar. Aynı zamanda okzalasetatın glukoneogenezde kullanılmasından dolayı da sitrik asit devri yavaşlar. Bu şartlarda karaciğerde teşekkül eden büyük miktardaki keton cisimleri kana salınır. Bundan sonra beyin, glukoz yerine kayda değer oranda asetoasetat kullanmaya başlar. Beynin enerji ihtiyaçlarının yaklaşık üçte biri keton cisimlerinden sağlanır (Tablo 15.2). Kalp dokusu da keton cisimlerini yakıt olarak kullanır. Yakıt kullanımındaki bu değişikliğe ketoziz adı verilir.

Tablo 15.2. Açlık halinde yakıt metabolizması.

Yakıt değişimi ve tüketimi	24 saatte oluşturulan veya tüketilen (gram)	
	3. gün	40.gün
Beynin yakıt kullanımı		
Glukoz	100	40
Keton cisimleri	50	100
Glukozun diğer kullanımı	50	40
Yakıt mobilizasyonu		
Yağ dokusu lipolizi	180	180
Kas proteini yıkımı	75	20
Karaciğerden salınan yakıt		
Glukoz	150	80
Keton cisimleri	150	150

Birkaç hafta sonra keton cisimleri beynin en başta gelen yakıtı olur (Tablo 15.2). Beyin ilk gündeki 120 gram/gün'e mukabil 40 gram/gün glukoza ihtiyaç duyar. Karaciğer tarafından yağ asitlerinin etkili bir şekilde keton cisimlerine dönüştürülmesi ve bunların da beyin tarafından kullanılabilmesi glukoz ihtiyacını önemli ölçüde azaltır. Böylece ilk günlere nisbeten daha az kas proteini yıkılır. İlk günlerdeki 75 grama mukabil ilerleyen haftalarda 20 gramlık protein yıkımı hayatın devamı için en önemli noktadır. Netice olarak şunu söyliyebiliriz: Aç olarak yaşama süresini tayin eden en önemli faktör triaçilgliserol depolarının büyüklüğüdür.

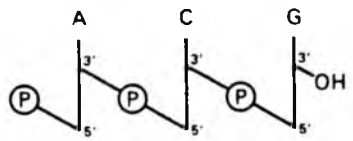
16. BÖLÜM: D N A : G E N E T İ K R O L Ü , Y A P I S I V E R E P L İ K A S Y O N

Deoksiribonükleik asit (DNA), kalıtım (irsiyet) molekülüdür. Çok sayıda deoksiribonükleotid birimlerinden oluşmuş çok uzun ipliğimsi bir makromoleküldür. DNA'daki pürin ve pirimidin bazları genetik bilgiyi taşırken, şeker ve fosfat gruplarının yalnız yapısal özellikleri vardır. Bu bölümde DNA'nın yapısı, genetik rolü ve replikasyonu (eşleşme) üzerinde duracağız. İzahlarımızda çok daha basit olması ve bütün organizmalara genelleştirilebilecek özellikler taşıması sebebiyle prokaryotik DNA'yı temel olarak alacağız. Yeri geldikçe ökaryotik DNA'daki farklılıkları da belirteceğiz.

16.1 DNA'NIN YAPISI VE GENETİK ROLÜ

DNA omurgası bütün molekül boyunca aynı olup, fosfodiester koprülerine bağlanmış deoksiribozlardan ibarettir. DNA'nın değişken kısmı baz sırasıdır(Şekil 8.2). DNA dört çeşit baz ihtiva eder: adenin (A) ve guanin (G) pürinleri ile timin (T) ve sitozin (C) pirimidinleri.

DNA zincirinin yapısı aşağıdaki gibi de gösterilebilir:



Burada A,C,G harfleri bazları ve dikey çizgiler de deoksiribozları temsil etmektedir. (P), fosfat grubunun yaptığı 3',5'-fosfodiester bağı köşegen çizgiyle gösterilirken, zincirin 5'-OH ucu bir fosfatla esterleşmiş, 3'-OH ucu ise serbest hidroksili olarak görülmektedir. Yukarıdaki nükleotid kısaca pApCpG veya ACG sembolleriyle de gösterilebilir. Bu zincirin bir ucu bir başka nükleotide bağlanmamış 5'-OH, diğeri de 3'-OH olduğuna göre, ACG sembo-

lünden 5'-OH grubunun deoksiadenozine, 3'-OH grubunun ise deoksiguanozine ait olduğu bilinmelidir.Baz sırası 5'→3' yönünde yazılır. Hatırlanacağı gibi bir proteinin amino asit sırası da amino ——→ karboksil şeklinde yazılmaktaydı. Aynen Glu-Phe-Ala bileşiği Ala-Phe-Glu'dan farklı olduğu gibi, ACG'de GCA'dan farklı bir bileşiktir.

DNA ve RNA (ribonükleik asit) moleküllerini içine alan nükleik asitler veya bir başka tabirle polinükleotidler 1872 yılında keşfedilmişti. Fakat, bunların biyolojik ve genetik önemleri 50 yıl kadar aydınlatılamadı. 1928 yılında Fred Griffith pnömokok bakterileriyle yaptığı bir çalışmada patojenik olmayan R mutantını patojenik S formuna dönüştürdü. Bu bakteriler normal olarak insan ve diğer memelilerde zatürre oluşturmak için gerekli olan polisakkarit bir kapsülle sarılıdır. Bu polisakkarit kapsülden yoksun olan mutantlar (R mutantı) patojenik değildir. R mutantları, polisakkarit kapsüllerinin sentezi için gerekli olan UDP— glukuronatı sentezleyen dehidrogenaz enzimine sahip değillerdir.

Griffith canlı R ve ısı ile öldürülmüş S pnömokoklarını beraberce farelere enjekte etti. Bu karışımın fareyi öldürdüğünü şaşırarak müşahade etti. Halbuki bu bakterileri ayrı ayrı verdiği zaman fareye hiç de zararlı olmamıştı. Ölü farenin kanını incelediğinde canlı S pnömokoklara rastladı. Acaba ölü S ve canlı R mutantlarından nasıl olmuş da canlı S pnömokokları teşekkül etmişti? Aynı deneyi R mutantları ihtiva eden kültür ortamına ölü S hücrelerinin ekstraktini ilâve ederek tekrarladı. Bu sefer kültür ortamında canlı S mutantlarının üretdiğini gördü. Bu da kalıtım ile ilgili özelliklerin ısıdan etkilenmiyen bir bileşik üzerinde taşındığını göstermekteydi. Daha sonra 1944 yılında Oswald Avery, Colin MacLeod ve Maclyn McCarty pnömokoklardaki bu dönüşümün deoksiriboz tipi bir nükleik asit tarafından sağlandığını keşfettiler. Bu nükleik asit DNA'dan başka bir bileşik değildi. 1944 yılına kadar genetik bilginin koromozomdaki proteinler tarafından taşındığı zannediliyordu. 1951 yılında

E.coli bakterilerini enfekte eden bir virüs olan T2 bakteriyofajının DNA'sını ^{32}P ile, bunu saran proteinleri de ^{35}S ile işaretleyen Roger Herriott, protein kısmının tamamen hücre dışında kaldığını, DNA'nın ise E.coli içine girip birçok virüsün teşekkülüne sebebiyet verdiğini müşahede etti. Bu da DNA'nın genetik bilgiyi taşıdığını bir başka yolla ispatlamış oluyordu.

Bütün prokaryotik ve ökaryotik organizmaların genleri DNA'dan ibarettir. Virüslerde ise genler, hem DNA'dan hem de RNA'dan yapılmış olabilir. Meselâ tütün yapraklarını enfekte eden tütün mozaik virüsü (TMV), üzerinde en çok çalışılmış RNA virüsüdür. Tek bir RNA zinciri ve bunu saran 2130 adet birbirinin aynı polipeptid zincirinden meydana gelmiş bir protein kılıfından ibarettir. Virüs fenol ile muamele edildiği zaman protein kısmı RNA'dan ayrılır. RNA kısmı enfeksiyon yaparken, protein kısmı yaprağa zararsızdır.

16.1.a. Watson-Crick DNA Modeli

1953 yılında James Watson ve Francis Crick, DNA'nın üç boyutlu yapısını ortaya çıkardılar. DNA liflerinin X-ışını kırınım fotoğraflarını inceleyen bu iki bilim adamı, daha sonraları doğruluğu ispat edilmiş bir DNA yapı modeli ileri sürdüler. Modellerinin önemli yönlerini şöyle sıralayabiliriz:

1.İki polinükleotid zincir ortak bir eksen çevresinde sarılırlar (Şekil 16.1.a).

2.Pürin ve pirimidin bazları sarmalın (heliksin) iç tarafında yer alırken, fosfat ve şeker birimleri dış taraftadır. Baz düzlemleri sarmal eksenine diktir. Şeker düzlemleri bazlarınkiyle yaklaşık dik açı yaparlar (Şekil 16.1.b).

3.Sarmalın çapı 20 A°'dur. Komşu bazların sarmal ekseni boyunca aralarındaki mesafe 3,4 A° olup, 36°lik

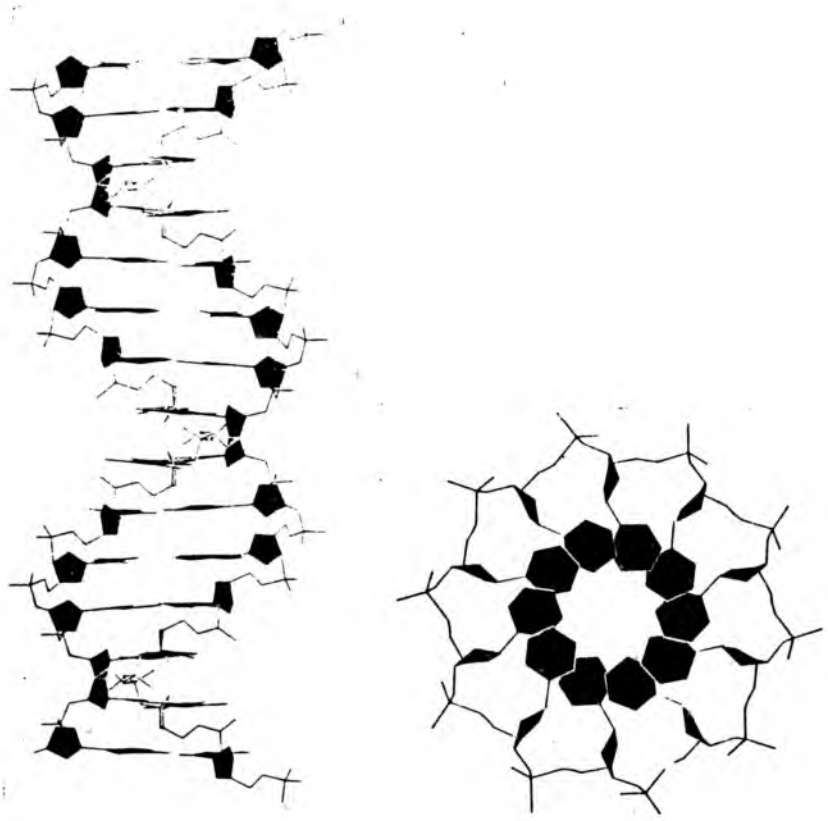
bir dönme yapmışlardır. Yani sarmal yapı, 10 bazda bir tekrar edilirken tam bir dönüş 34 A°'dur.

4.İki zincir, baz çiftleri arasındaki hidrojen bağlarıyla birarada tutulur. Adenin daima timin ile eşleşirken, guanin de sitozinle hidrojen bağı yapar (Şekil 16.2).

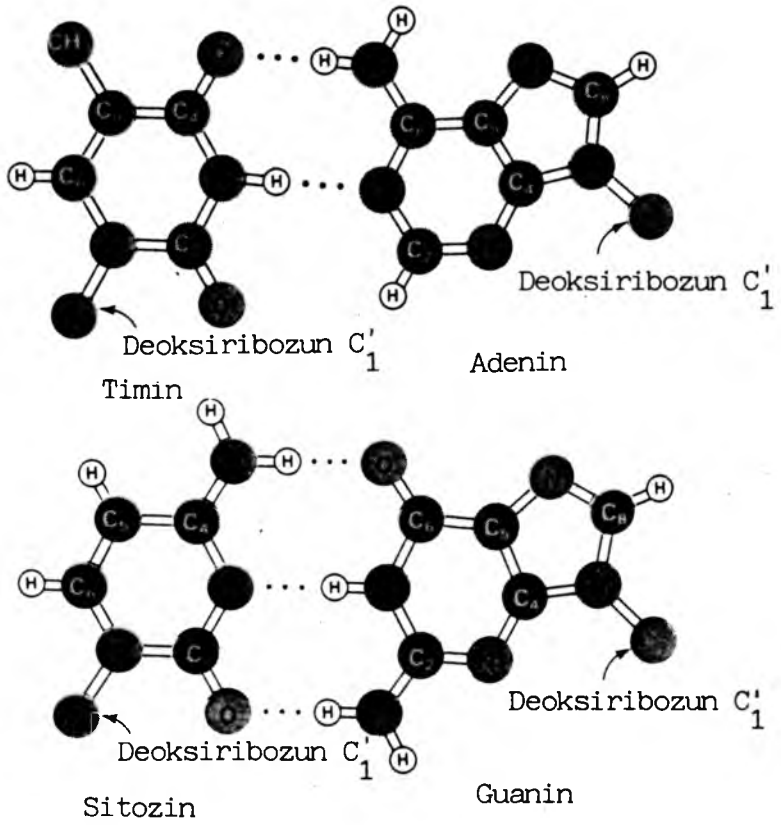
5.Bir polinükleotid zinciri boyunca bazların sıralanışı hiçbir şekilde sınırlanmamıştır ve bu sıralama genetik bilgiyi taşır.

DNA çift sarmalının en mühim özelliği baz çiftlerinin spesifikliğidir. Watson ve Crick, sterik ve hidrojen bağı faktörlerinden dolayı adeninin timinle (A-T), guaninin sitozinle (G-C) eşleştiğini ortaya çıkardılar. Sterik sınırlama, herbir polinükleotid zincirinin şeker-fosfat omurgasındaki düzgün sarmal yapıdan kaynaklanır. Birbiriyle eşleşmiş baz çiftine bağlı glikozidik karbonları arasında 10,85 A°'luk bir mesafe vardır. Bir pürin-pirimidin çifti bu boşluğa tam uyarken, iki pürin için bir darlık, iki pirimidin için hidrojen bağı mesafesini aşan bir fazlalık söz konusudur. Böylece sterik faktörlerden dolayı bir DNA sarmalında bir baz çifti üyesi pürin iken, diğerindeki pirimidin olmalıdır. Baz eşleşmesi ayrıca hidrojen bağı ihtiyaçları tarafından da sınırlandırılır. Pürin ve pirimidin bazları üzerindeki hidrojen atomlarının belirli pozisyonları vardır. Adenin sitozinle eşleşemez, çünkü karşılık gelecek hidrojen atomlarına sahip değildir. Aynı şekilde guanin de timinle eşleşemez. Bilâkis adenin timinle iki, guanin de sitozinle üç hidrojen bağı yapar (Şekil 16.2). Bazlar arasında kuvvetli bir etkileşme elde etmek için, bu hidrojen bağlarının uzaklıkları ve düzenlenmeleri en optimal şekildedir.

Bu modelin baz eşleşmesi ile ilgili yönleri 1950 yılında Erwin Chargaff tarafından elde edilen sonuçlarla da desteklenmektedir. Bu bilim adamı farklı türlerdeki DNA'lar üzerinde yaptığı denemelerde, hepsinin de A/T ve



Şekil 16.1. a) DNA çift sarmalının iskelet yapısı, **b)** Bir DNA çift sarmalı zincirlerinden birinin sarmal ekseninden aşağı görünüşü. Bir dönüşün on bazla tamamlandığı, bazların hepsinin iç, şeker ve fosfatların dış tarafta olduğu görülüyor.



Şekil 16.2. Adenin-timin ve guanin-sitozin baz çiftlerindeki atomların düzenlenişi ve hidrojen bağları.

G/C oranlarının 1,0 olduğunu bulmuştur. Bu eşitliklerin manası Watson-Crick modeli açıklanıncaya kadar bilinmiyordu.

Bir ökaryotik canlının bütün hücrelerindeki DNA'lar aynıdır ve hücre nükleusunda yer alırlar. Histon adı verilen ve lisin ile arginince zengin bazik proteinler, birleşik ve kromozomlar arasında bölünmüş halde bulunurlar. Ökaryotlarda, nükleer DNA'nın yanısıra sitoplazmalarında uydu DNA adı verilen molekül ağırlığı ve baz bileşimi yönünden farklı DNA molekülleri de vardır. Bunun bir çeşidi de mitokondrilerde ve bitki kloroplastlarında bulunur.

İster prokaryotlarda, ister ökaryotlarda olsun, bütün DNA moleküllerinin en önemli ortak özellikleri çok büyük olmalarıdır. Meselâ E. coli kromozomu tek ve çok büyük bir DNA çift zincirinden ibaret olup, molekül ağırlığı 2.600.000.000'dur. Kalınlığı 20 A° ve uzunluğu 1400 mikron veya 1,4 mm'dir. 4,0 milyon kadar baz çifti ihtiva eder. Bu büyük DNA molekülünün ucu yoktur ve iki ucu dairesel bir yapı oluşturmak üzere birleşmiş haldedir. DNA'nın yerleşiminde en fevkalâde husus, E. coli hücresinin 1000 misli kadar uzunluktaki bu molekülün, çok küçük bir hacim içinde sıkıştırılmış olmasıdır.

Ökaryotik hücreler türden türe farkeden sayıda birçok kromozom ihtiva eder ve herbir kromozom da bir veya daha fazla çok büyük DNA moleküllerinden ibarettir. Tek bir memeli hücresindeki DNA'ların toplam uzunluğunun 2 metreden fazla, baz çiftlerinin sayısı E. colininkinden 1000 misli fazladır. DNA moleküllerinin değişik organizmalardaki büyüklükleri Tablo 16.1'de verilmiştir.

Tablo 16.1. DNA moleküllerinin büyüklükleri.

Organizma	Baz çifti sayısı$\times 10^3$	Uzunluğu(μm)
Virüsler		
Polioma veya SV 40	5,1	1,7
λ-faj	48,6	17
T2-faj	166	56
Vaccinia	190	65
Bakteriler		
Mikoplazma	760	260
E.coli	4.000	1.360
Ökaryotlar		
Maya	13.500	4.600
Drosophila	165.000	56.000
İnsan	2.900.000	990.000

16.1.b. DNA Moleküllerinin Sulu Çözeltilerdeki Özellikleri

DNA moleküllerinin sulu çözeltilerinin bir takım karakteristik özellikleri vardır. Bunlardan bazılarını sırayla inceleyelim.

1.Asit-baz özellikleri: Komşu mononükleotidler arasında köprü vazifesi gören sekonder fosfat grupları oldukça düşük pK_a değerlerine sahiptir. Bu yüzden DNA, pH 4'ün üzerinde tamamen iyonlaşmış bir polibazik asittir. Bu fosfat grupları, sarmalın çevresinde tamamiyle suya yönelmiş haldedir. Mg^{+2} ve Ca^{+2} gibi iki değerlikli basit katyonlara kuvvetlice bağlanabilecekleri gibi, bazı virüs ve bakteri DNA'larında da spermin ve spermidin gibi polikatyonik aminlerle de etkileşebilirler. DNA çift sarmalının poliaminlerle bu şekilde bağlanması, negatif yüklerinin nötralize ederek molekülün daha esnek bir özellik kazanmasını sağlar. Ökaryotik hücrelerin kromatinlerinde bulunan ve bazik proteinler (pozitif yüklü) olan histonlar da DNA molekülleriyle kuvvetlice bağlanırlar. Bu proteinlerin yapısındaki R gruplarından, pH 7,0'nin üzerinde pozitif yüklü olan arginin ve lisin rezidüleri düzenli olarak sıralanmışlardır. DNA çift sarmalı çevresinde yine periyodik bir yerleşime sahip olan negatif yüklü gruplarla etkileşebilirler.

Bazların hidrojen bağı yapabilme dereceleri pH'ya bağlı olduğundan, DNA çift sarmalında bulunan baz çiftlerinin hidrojen bağlarının kararlılıkları da pH ile değişir. Baz çiftleri pH 4,0-11,0 arasında maksimum kararlılığa sahiptir. Bu sınırların dışında DNA sarmalı bozulur ve açılır.

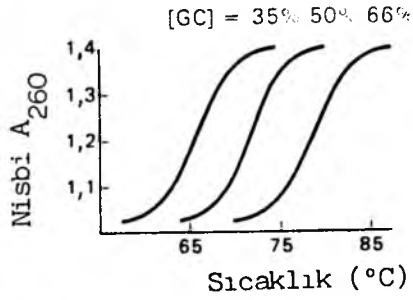
2.Vizkozite: Çift sarmalın sağlamlığı ve küçük çapına nisbeten çok fazla uzunluğu, çok seyreltik DNA çözeltilerinin bile vizkozitesinin yüksek olmasına yol açar. DNA moleküllerinin denatürasyonu ve açılması vizkozite ölçümleriyle takip edilebilir.

3.Sedimentasyon özellikleri: DNA nümunelerinin sedimentasyon katsayıları ve molekül ağırlıkları, aynen proteinlerde olduğu gibi, ultrasantrifüj kullanılarak elde edilir. Bununla beraber DNA moleküllerinin olağanüstü uzunlukları ve çözeltilerinin vizkoz olmaları yüzünden sedimentasyon ölçümleri bir seri düşük DNA konsantrasyonlarında yapılır ve sonra sıfır konsantrasyona ekstrapole edilir. DNA'nın çökelme sınırı 260 nm'deki spektrofotometrik ölçümlerle belirlenir. Bu dalga boyunda DNA maksimum absorbsiyon verir. DNA moleküllerinin sedimentasyon katsayıları, umumiyetle bir sukroz dansite gradiyetinde sedimentasyon katsayısı bilinen bir DNA örneğinin hızıyla mukayese edilerek bulunur.

4.DNA'nın denatürasyonu: DNA'nın çift sarmal yapısı; (1) yüksek ve düşük pH'larda, (2) ısıtılınca, (3) sulu ortam dielektrik sabitinin alkoller ve ketonlar vb. organik solventlerle düşürülünce ve (4) üre, amidler ve benzeri çözünenlere maruz bırakılınca açılarak düzensiz katlanma ve sarılmalara uğrar. Bu davranışa proteinlerde de rastlamıştık. DNA denatürasyonu esnasında omurgadaki kovalent bağlardan hiçbiri parçalanmaz. DNA'nın çift sarmal yapısının devamından sorumlu olan, baz çiftleri arasındaki hidrojen bağlarına ve biraraya sıkışmış bazlar arasındaki hidrofobik etkileşmelere yukarıda saydığımız denatüre edici faktörler tesir ederler.

Tabii DNA'nın denatürasyonu sonucu fiziksel özelliklerinde de birtakım değişiklikler meydana gelir: (1) Vizkozite azalır, (2) 260 nm'deki absorbsiyon artar ve (3) Optik çevirme daha negatif olur. DNA denatürasyonunun derecesini tesbitte en basit yol, **hiperkromik etki** adı verilen 260 nm'deki absorbsiyon artışını spektrofotometrik yoldan takip etmektir. Bu artışın sebebi şudur: Çift sarmallı DNA molekülleri bileşimlerindeki mononükleotidlerin toplam absorbsiyonlarından daha az ışık absorblarlar. Bu olaya hiperkroizm adı verilir. Eğer DNA ısıtılırsa denatürasyon sonucu DNA nümunesinin cinsine göre A_{260}, % 20-% 60 arasında bir artışa maruz kalır.

DNA çift sarmalının ayrılmasına bazen erime adı da verilir, çünkü belirli bir sıcaklıkta ani olarak meydana gelir. Sarmal yapının yarısının kaybolduğu sıcaklık, **erime sıcaklığı** (T_m) olarak tarif edilir. Bu geçişin ani olması DNA çift sarmalının oldukça kooperatif bir yapıya sahip olduğunu gösterir. Bir DNA molekülünün erime sıcaklığı baz bileşimine önemli ölçüde bağlıdır. G-C baz çiftlerince zengin DNA molekülleri, daha çok A-T baz çifti taşıyan DNA'lara göre daha yüksek T_m değerine sahiptir (Şekil 16.3).



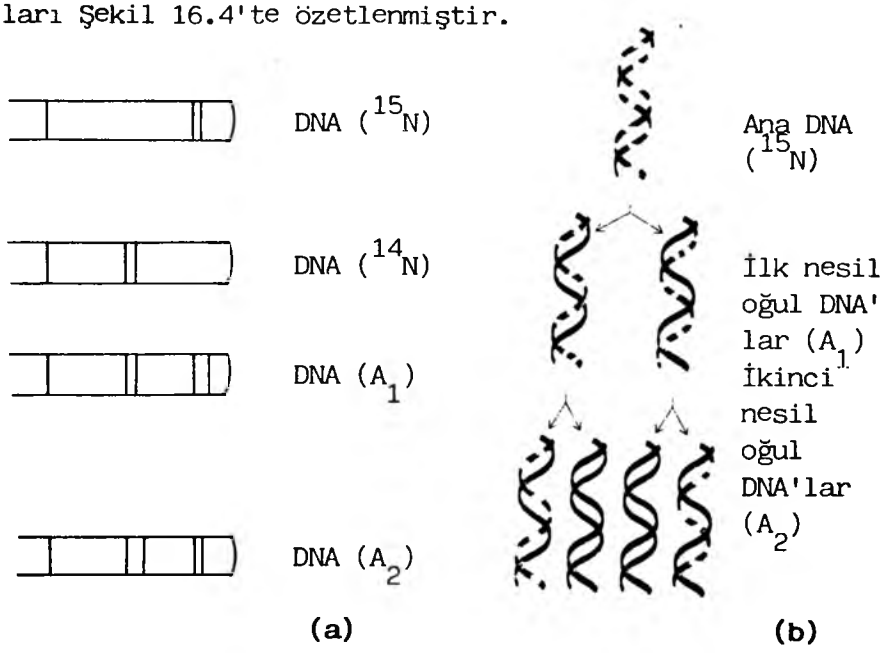
Şekil 16.3. 25 °C'deki A_{260}'a göre elde edilen nisbi absorbansların sıcaklığın fonksiyonu olarak çizilmesiyle elde edilen DNA erime eğrileri.

Gerçekten farklı türlerden elde edilen DNA'ların T_m'si G-C muhtevasının % 20'den % 78'e değişmesiyle 77°C'dan 100°C'a artmaktadır. G-C baz çiftleri arasında üç hidrojen bağının bulunması bu çifti, aralarında iki hidrojen bağı bulunan A-T çiftinden daha kararlı yapar. Meselâ E.coli DNA'sında (% 50 G-C çifti) T_m=69°C, P. aeruginosa DNA'sında (%68 G-C çifti) T_m 76°C'dır. Hücre içinde çift sarmal, spesifik proteinler tarafından ATP hidrolizi ile eritilir.

16.2. DNA REPLİKASYONU

Watson ve Crick, oğul DNA molekülündeki zincirlerden birinin yeni sentezlendiğini ve diğerinin ana DNA mo-

leküllünden geldiğini ileri sürdüler. Yani, DNA molekülünden bir başka DNA molekülünün sentezlenmesinde zincirlerin yarısı korunmakta ve diğer yarısı yeniden sentezlenmektedir. Bu yüzden DNA eşleşmesi olayı semikonservatiftir. Matthew Meselson ve Franklin Stahl tarafından bu hipotezi desteklemek amacıyla bir deneme yapıldı. Azot kaynağı olarak yalnız $^{15}NH_4Cl$ ihtiva eden bir ortamda E.coli birçok nesil üretildi. Bakteriler daha sonra hemen normal azotlu (^{14}N) bir ortama transfer edildiler. Birbirini takip eden replikasyonlarda elde edilen DNA'lardaki ^{14}N ve ^{15}N dağılımı dansite gradientli denge sedimentasyonu metodu ile tayin edildi. $^{15}NH_4Cl$'lü ortamda üretilen ve bütün DNA'lardeki azotların ^{15}N ile işaretlendiği farzedilen E.colilerin, ^{14}N'lü ortamdaki ilk nesillerine A_1, ikinci nesillerine A_2 denilirse, bunlardan elde edilen DNA'ların dansite gradientli denge sedimentasyonu sonuçları Şekil 16.4'te özetlenmiştir.



Şekil 16.4. Semikonservatif replikasyonun şematik gösterilişi: **(a)** Saf ^{15}N ve ^{14}N'li DNA'lar ile A_1 ve A_2 DNA'larının dansite gradientli sedimentasyonu, **(b)** DNA sı ^{15}N-lu E. colilerin ^{14}N'lu ortamda iki nesil üremeleri.

16.2.a. DNA Sentezinde Rol Alan Enzimler ve Proteinler

DNA sentezindeki moleküler olaylar üzerinde ilk çalışmalar, 1955 yılında, Arthur Kornberg ve arkadaşları tarafından başlatılmıştır. Bu çalışmalarda önce hayvan hücreleri ekstraktleri kullanılmış ve olumlu bir netice alınamamıştır. Daha sonra E.coli bakterisi üzerinde çalışılmaya karar verilmiştir. Çünkü bu bakteri 20 dakikada bölünüp, kısa sürede büyük miktarda E.coli üretmek mümkün olmaktaydı.

Kornberg ve arkadaşları, E.colide DNA sentezini katalizleyen enzim olarak 109 kdal molekül ağırlığında DNA polimeraz I enzimini keşfettiler. Burada I numarasının verilmesinin sebebi sonraları başka DNA polimerazların bulunmasıydı. Daha sonraki yıllarda yine E.coli ile yapılan araştırmalar, çok sayıda enzim ve proteinlerin DNA replikasyonunda doğrudan görev aldığını göstermiştir(Tablo 16.2). Genetik analizler bunların sayısının en az onbeş olduğunu ortaya koymaktadır.

E.coli bugün moleküler biyoloji seviyesinde üzerinde en çok araştırma yapılmış olan bir organizmadır. Prokaryot bir canlı olan E.coli basit bir canlı olduğundan, burılardan elde edilen değerli sonuçlar, çok daha yüksek organizmalardaki olayları açıklamada birer ipucu teşkil etmişlerdir. Gerek DNA replikasyonunda, gerekse bundan sonraki bölümde yer alan transkripsiyon ve protein sentezi olaylarında anlatacaklarımız tamamen E.coli'den elde edilen bilgiler olacaktır. Yeri geldikçe ökaryotik hücrelerde vuku bulan benzer olaylarla aralarındaki farklılıklara da temas edilecektir.

DNA polimeraz I enziminin fonksiyon ve özellikleri: 109 kdal molekül ağırlığında bir polipeptid zincirinden ibaret olan DNA polimeraz I enzimi, bir DNA zincirine birer birer deoksiribonükleotid birimlerinin ilâve edilmesini katalizler:

Tablo 16.2. E.coli'nin replikasyon protein ve enzimleri.

Protein	Rolü	Mol ağ.(kdal)
dnaB Proteini	Primazın çalışmasını başlatır.	~250
Primaz	RNA primerlerini sentezler.	60
rep-Protein	Çift sarmalı açar.	65
SS-Bağlama proteini	Açılmış bölgeyi tek zincir olarak stabilize eder.	74
DNA giraz	Süperheliks bükülmelerini oluşturur.	400
DNA polimeraz III	DNA sentezler.	>300
DNA polimeraz I	Primeri siler ve boşlukları doldurur.	109
DNA polimeraz II	Fonksiyonu bilinmiyor.	-
DNA ligaz	DNA uçlarını birleştirir.	74

$$(DNA)_{n\ rezidü} + dNTP \rightleftharpoons (DNA)_{n+1} + PP_i$$

Bir DNA zincirinin sentezlenmesi için DNA polimeraz I enzimi aşağıdaki komponentlere ihtiyaç duyar:

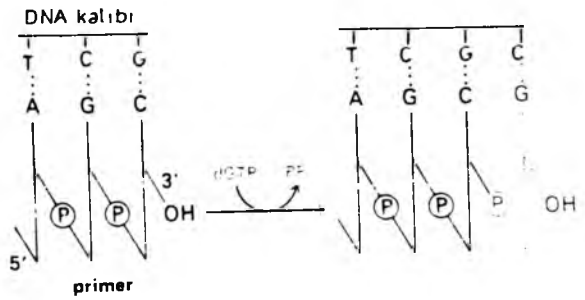
1. Dört deoksiribonükleosit-5'-trifosfatların, yani dATP, dGTP, dTTP ve dCTP'nin hepsi de ortamda mevcut olmalıdır. Mg^{+2} de gereklidir.

2. DNA polimeraz I, deoksiribonükleotidleri, önceden mevcut olan DNA (veya bir RNA)'nın 3'-OH ucuna ilâve eder. Diğer deyişle, serbest 3'-OH grubuna sahip olan bir primer zincire ihtiyaç vardır.

3. Bir DNA kalıbı gereklidir. Kalıp, tek veya çift zincirli olabilir.

DNA polimeraz tarafından katalizlenen zincir uzaması reaksiyonu, primerin 3'-OH ucunun, deoksiribonükleosit trifosfatın en içteki fosfor atomuna nükleofilik saldırısı vasıtasıyla gerçekleştirilir. Bir fosfodiester bağı teşekkül ederken aynı anda da pirofosfat salınır. Bu pirofosfatın daha sonra hidrolizlenmesi ile uzama reaksiyonu daha ileriye kayar. DNA zinciri 5'→3' yönünde uzar.

DNA polimeraz molekülü başına saniyede yaklaşık on nükleotid ilâve edilir. Enzim kalıptan ayrılmadan polimerizasyon devam eder:

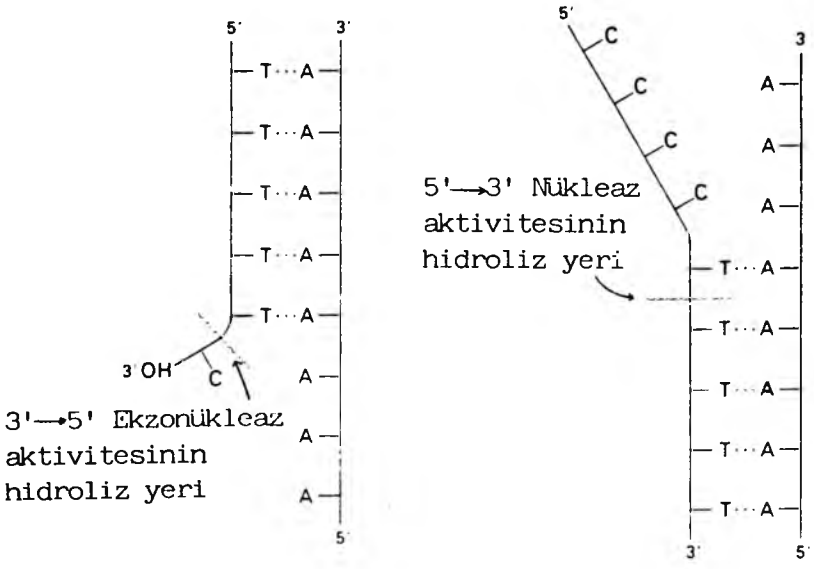


DNA polimerazın bir fosfodiester bağı teşekkülünü sentezleyebilmesi için, eklenecek nükleotidin kalıp zinciri üzerindeki baza komplamenter olması icabeder. Nükleotid bazı ve kalıp zinciri üzerindeki baz, bir Watson-Crick tipi baz çifti oluşturmazlarsa kovalent bir bağlanma ihtimali oldukça düşüktür. Özetle DNA polimeraz I, bir kalıp tarafından yöneltilen bir enzim olup, bu tip enzimler içinde ilk keşfedilenidir.

DNA polimeraz I'in bir başka enzimatik özelliği de belirli şartlarda DNA zincirlerini hidrolizlemesidir. Gerçekten bu enzim DNA zincirinin 3'-OH ucundan başlayarak DNA'yı mononükleotidlere parçalayabilir. Yani DNA polimeraz bir 3'⟶5' ekzonükleazdır (Şekil 16.5.a). Zincirden hidrolizlenen nükleotidin serbest bir 3'-OH grubu olmalı ve çift sarmalın bir parçası olmamalıdır. Sentetik polinükleotidlerle yapılan denemeler enzimin 3'⟶5' ekzonükleaz aktivitesinin polimerizasyon olayında bir düzeltme mekanizması olduğunu göstermiştir. Meselâ Şekil 16.5a'da uzun bir dA polimeriyle dT nükleotidlerinden ibaret bir sıra, bir çift sarmal oluşturmaktadır. Bu poli dT zincirinin 3'-OH ucunda bulunan bir dC rezidüsü hidrojen bağı yapmamıştır, çünkü dA ile komplamenter değildir. DNA polimeraz I ve dTTP ilâve edildiği zaman dT birimleri zincire eklenmeden önce, uyuşmayan dC birimi hidrolizlenir. Bunun gibi muhtelif sentetik polimerlerle yapılan deneyler DNA polimeraz I'in zincir uzatmayı devam ettir-

meden önce primer uçtaki uyuşmayan rezidüleri uzaklaştırdığını göstermiştir.

Görüldüğü gibi DNA replikasyonu çok doğru olarak gerçekleşmektedir. Önce baz çifti, çift sarmala uymadıkça, polimerleşme genellikle olmamaktadır. Bununla beraber, bu safhada bir hata yapılmışsa, DNA polimeraz I tarafından düzeltilmektedir.

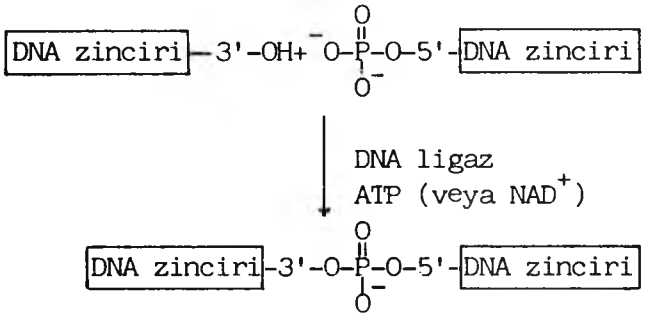


Şekil 16.5. DNA polimeraz I'in (a) 3'⟶5', (b) 5'⟶3' ekzonükleaz aktivitesi.

DNA polimeraz I, DNA'yı 5' ucundan başlayarak da hidrolizleyebilir. Bu 5' ⟶ 3' ekzonükleaz aktivitesi (Şekil 16.5.b) 3' ⟶ 5' ekzonükleaz etkisinden çok daha farklıdır. Önce, parçalanan bağ çift sarmalın bir parçasıdır. Sonra, hidrolizlenme uç fosfodiester bağından veya 5' ucundan birkaç rezidü uzaktan gerçekleştirilir. Üçüncü farklı nokta da DNA sentezi beraberliğinde 5'⟶ 3' ekzonükleaz aktivitesi daha da kuvvetlenir. Son olarak da enzim üzerindeki 5'⟶3' ekzonükleaz aktif bölgesi, polimerizasyon ve 3' ⟶ 5' hidroliz aktivite merkezlerinden ayrıdır. Özetle, DNA polimeraz I, birbirinden farklı iki

enzimi bir polipeptid zinciri üzerinde ihtiva etmektedir. 5'⟶3' ekzonüklaz aktivitesi, farklı tipteki hataları düzelterek, 3'⟶5' ekzonükleaz aktivitesini tamamlamaktadır. Meselâ 5'⟶3' ekzonükleaz, DNA'nın UV ışığa maruz kalması sonucu oluşan primidin dimerlerinin uzaklaştırılmasında görev yapmaktadır. Ayrıca DNA replikasyonunun kendisinde de kilit bir role sahiptir.

DNA ligaz: DNA polimeraz I, bir primer zincire deoksiribonükleotidleri ekleyebilir, fakat iki DNA zincirinin birleştirilmesini ve tek bir DNA zincirinin bir çember şeklinde kapanmasını sağlayamaz. 1967 yılında, bu işleri katalizleyen DNA ligaz enzimi keşfedildi. Bu enzim iki DNA zinciri arasında fosfodiester bağı oluşmasını katalizler:



Enzimin bu aktivitesini göstermesi için, bir DNA zinciri 3'-ucunda serbest bir OH ve diğer DNA zincirinin 5'-ucunda bir fosfat grubu bulunmaktadır. Bu endergonik reaksiyon için gerekli enerji E.coli ve diğer bakterilerde NAD^+, hayvan hücrelerinde ise, ATP tarafından sağlanır.

DNA ligazın bir başka kaydadeğer yönü de, bu enzim tarafından birleştirilen DNA zincirlerinin bir DNA çift sarmalının parçası olmaları zorunluluğudur. Bu birleştirme prosesi, normal DNA sentezi, DNA hasarlarının tamiri ve DNA rekombinasyonu için gereklidir.

DNA polimeraz II ve III: DNA polimeraz I'in DNA'yı in vitro olarak sentezleyebildiğini ve tamir edebildiğini gördük. Acaba bu fonksiyonlarını in vivo olarak da görebilmektedir? Çünkü bir enzim in vitro olarak katalizlediği bir reaksiyonu in vivo katalizliyemiyebilir. Bir hücre içindeki reaksiyon şartları farklı olabilir veya aynı reaksiyonu katalizleyen başka enzimler de bulunabilir. Gerçekten E.coli'nin DNA polimeraz I'den başka II ve III olarak gösterilen başka DNA polimerazları da ihtiva ettiği 15 yıl sonra keşfedilmiştir. Bu sürenin uzunluğuna polimeraz I'in perdelemesi sebep olmuştur.

Bu enzimler şu yönlerden DNA polimeraz I'e benzemektedirler:

1.Kalıba bağlı olarak dNTP'lerden DNA sentezleyebilmektedirler.

2.Serbest 3'-OH grubu ihtiva eden bir primere ihtiyaç duymaktadırlar.

3.Sentez 5'⟶3' yönündedir.

4.Her ikisi de 3'⟶5' ekzonükleaz etkisine sahiptirler.

Bu polimerazların kalıp tercihleri farklıdır. Kısa boşluklar ihtiva eden çift zincirli DNA kalıpları üzerinde optimum etki gösterirler. Çift sarmallı bölgelerin yakınındaki uzun tek zincirli bölgeler, polimeraz I tarafından daha çok tercih edilmektedir. Bu enzimlerin in vitro maksimum katalitik hızları da farklıdır. Polimeraz I tarafından saniyede 10 nükleotid ilâve edilirken, polimeraz II tarafından 0,5 ve polimeraz III tarafından da 150 adet nükleotid zincire eklenir. DNA polimeraz III fizyolojik olarak aktif iken başka proteinlerle birleşik haldedir.Bu çok alt birimli komplekse DNA polimeraz III holoenzim kompleksi adı verilir.

Acaba bu polimerazların in vivo fonksiyonları nedir? İleride de kısaca izah edileceği gibi, polimeraz

III'ü ihtiva eden bir multienzim kompleksi, yeni DNA'ların çoğunu sentezlerken, DNA polimeraz I de primeri siler ve boşlukları doldurur. DNA polimeraz II'nin in vivo fonksiyonu henüz bilinmemektedir.

DNA sentezindeki primer zincir: Şimdi DNA sentezinin nasıl başladığı sorusunu cevaplandırmağa çalışacağız. Hatırlanacağı gibi, DNA sentezinin başlaması için serbest bir 3'-OH grubu ihtiva eden bir primere ihtiyaç vardır. Bununla ilgili en önemli ipucu DNA sentezinin başlaması için RNA sentezinin gerekli olduğunun gözlenmesi ile elde edildi. Bu buluş RNA'nın DNA sentezinde primer olabileceği fikrini kuvvetlendirdi. Çünkü RNA polimerazlar hiçbir primere ihtiyaç göstermeksizin RNA zincirlerinin sentezleyebiliyorlardı. Daha sonraları bir RNA zincirinin DNA sentezinde primer olarak görev yaptığı anlaşılmıştır.

Şimdi E.coli'deki RNA replikasyonunun büyük bir ihtimalle aşağıda özetlediğimiz şekilde gerçekleştiğini söyliyebiliriz.

1.Primaz adı verilen özel bir RNA polimeraz, DNA kalıbı zincirlerinden birisine komplamenter olacak sırada yaklaşık 10 nükleotid biriminden ibaret kısa bir RNA zinciri sentezler. Primaz, polimerizasyon için bir primere ihtiyaç göstermez.

2.Bu RNA zincirinin uç 3'-OH grubu yeni DNA'nın sentezinde primer olarak görev yapar. Yeni DNA'nın çoğu DNA polimeraz III holoenzim kompleksi tarafından sentezlenir.

3.RNA-DNA hibridinin RNA kısmı, DNA polimeraz I tarafından hidrolizlenir.

4.RNA'nın uzaklaştırılmasıyla DNA parçaları arasında meydana gelen boşluklar yine DNA polimeraz I tarafından doldurulur.

Son yıllarda yapılan araştırmalar, primaz enziminin etkisinden önce, aralarında dnaB de bulunan en az beş protein, bir ATP hidroliziyle, DNA'ya sarılarak primazı aktifleştirecek sinyallerin ortaya çıkmasını sağladığını göstermiştir. DNA replikasyonunun zamanlaması çok kritiktir, çünkü bu proses hücre bölünmesi ile koordineli olarak yürür.

Replikasyonda ana DNA çift sarmalının açılması ve giraz aktivitesi: E.colideki replikasyon mekanizması üzerinde son yıllarda yapılan araştırmalar, ana çift sarmalının bir çatal şeklini andıran replikasyon bölgesinde repprotein adı verilen bir enzim tarafından gayet etkili bir tarzda açıldığını göstermiştir. Bu açılma için gerekli enerjinin ATP hidroliziyle sağlandığı bu reaksiyonu katalizleyen enzime helikaz adı da verilir. Ayrılan her bir baz çifti için yaklaşık iki ATP harcanır. Ana DNA'nın ayrılmış olan zincirlerinin herbiri, daha sonra tek zincirli DNA'ya bağlanma proteininin birkaç molekülü ile etkileşir (SS-bağlama proteini). SS-bağlama proteini, helikaz etkisiyle oluşturulmuş olan tek zincirli DNA'yı stabilize eder. Bunun sonucu olarak da bölge bir kalıp olarak görev yapabilir. SS-bağlama proteinlerine erime proteinleri adı da verilir.

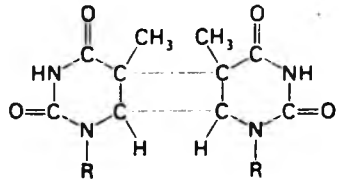
Çember yapıdaki DNA çift sarmallarının (E.coli kromozomu gibi) açılması sırasında süper bükülmeler (supertwists) adı verilen topolojik bir problem ortaya çıkar. Bu problemin DNA giraz enzimi tarafından halledildiği son yıllarda Martin Gellert tarafından keşfedilmiştir. DNA'nın tersiyer yapısının gevşetilmesini kapsayan bu olay termodinamik yönden uygun olduğundan ATP harcanmasına ihtiyaç yoktur.

16.2.b. DNA Üzerindeki Hasarların Onarımı

DNA, birçok kimyasal ve fiziksel faktörler tarafından tahrip edilebilir. Bütün hücrelerde bu tahribatı onaracak mekanizmalar mevcuttur. Bu tahribat esnasında baz-

lar değişebilir ve kaybolabilir, omurga üzerindeki fosfodiester bağları kopabilir ve zincirler arasında çarpraz bağlanmalar teşekkül edebilir. Bütün bu hasarları iyonlaşmaya sebep olan radyasyonlar, ultraviyole ışık ve muhtelif kimyasal bileşikler meydana getirebilir. Bu hasarların büyük bir kısmı tamir edilebilir, çünkü genetik bilgi her iki zincir üzerinde de mevcut olup zincirlerin biri tarafından kaydedilen bilgi çift sarmalın diğer zincirinden tekrar elde edilebilir.

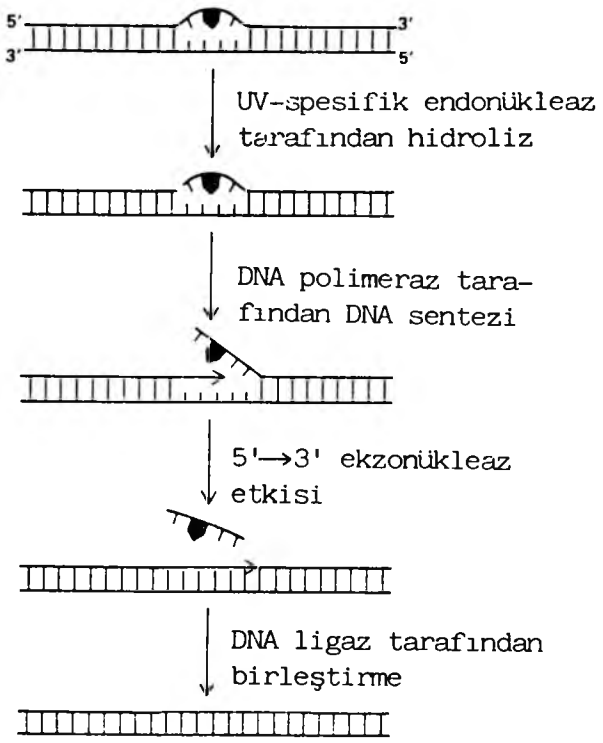
Tamir mekanizması en iyi anlaşılmış bulunan hasar, DNA'nın UV ışığa maruz kalmasıyla oluşan piridin dimerleridir. Bir DNA zinciri üzerinde komşu iki pirimidin rezidüsü bu durumda birbirlerine kovalent olarak bağlanabilir. Böyle bir pirimidin dimeri (meselâ aşağıdaki timin dimeri gibi) bir çift sarmal yapısına uymadığından, replikasyon ve gen ifadesi hasar uzaklaştırılıncaya kadar bloke edilir, yani durdurulur.



Timin dimeri

Bu onarım işi için dört çeşit enzim aktivitesine ihtiyaç vardır(Şekil 16.6). Önce, bir UV-spesifik endonükleaz bozuk bölgeyi tesbit eder ve genellikle 5' tarafından dimer yakınında bir ester bağını hidrolizler. Dimeri taşıyan kısım açılır ve DNA polimeraz I tarafından 5'⟶3' yönünde tamir sentezi için zemin hazırlar.

Daha sonra pirimidin dimerini taşıyan kısım, DNA polimerazın 5'⟶3' ekzonükleaz aktivitesiyle uzaklaştırılır. Son olarak da yeni sentezlenen DNA uzantısı ile DNA zincirinin önceden bulunan kısmı DNA ligaz tarafından



Şekil 16.6. Bir timin dimeri ihtiva eden bir DNA bölgesinin onarım basamakları.

birleştirilir. Pirimidin dimerleri fotokimyasal yolla da tersine dönüştürülebilir, yani iki ayrı pirimidine dönüştürülebilir. Hemen hemen bütün hücrelerde dimeri teşhis edip, mavi ışık absorblayarak onu orjinal bazlarına parçalayan bir fotoreaktive edici enzim bulunur.

17. BÖLÜM: RNA, TRANSKRİPSİYON, GENETİK ŞİFRE VE PROTEİN SENTEZİ

Şimdi sıra, DNA'da mevcut olan genetik bilginin ifade edilmesine, bir başka deyişle bilginin kullanılmasına gelmiştir. Genler, hücreler tarafından yapılan proteinlerin çeşitlerini tayin ederek etkilerini gösterirler. Bununla beraber, protein sentezinde kalıp olarak doğrudan doğruya DNA değil, RNA molekülleri (ribonükleik asit) görev yapmaktadır. Normal hücrelerde genetik bilginin akışı DNA transkripsiyon→ RNA translasyon→ protein yönündedir.

Bu bölümde önce RNA'ların yapıları ve tipleri hakkında bilgi verdikten sonra, yukarıda DNA'dan başlıyarak proteinde biten ve transkripsiyon ile translasyon safhalarını kapsayan genetik bilgi akışını ayrıntılı olarak inceleyeceğiz.

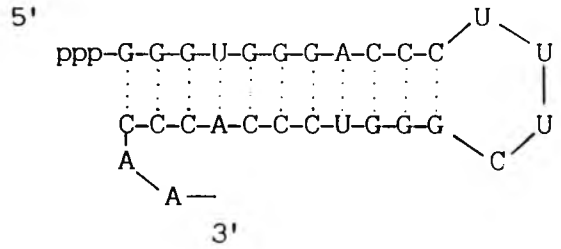
17.1. RNA'NIN YAPISI VE ÇEŞİTLERİ

RNA'nın protein sentezinde rol aldığı 1940'larda, yani DNA'nın genetik materyal olduğu gösterilmeden önce, az çok tahmin edilmekteydi. Torbjörn Caspresson, RNA ve DNA'nın 260 nm UV ışığını kuvvetli absorblaması ve yalnız DNA'nın Feulgen reaktifi ile boyanması özelliklerinden yararlanarak, RNA ve DNA'nın ökaryotik hücre içindeki dağılımını tesbit etmişti. DNA'nın hemen hemen tamamının nükleusta, RNA'nın çoğunun da sitoplazmada yer aldığını buldu. Jean Brachet de hücreleri sitoplazmik ve nükleer fraksiyonlara ayırdıktan sonra, herbirisinde DNA ve RNA için kimyasal analizler yaparak aynı sonucu elde etti. Ayrıca sitoplazmik fraksiyonda RNA'nın proteinlerle birleşmiş parçacıklar teşkil etmiş olduğunu da ortaya koydu. RNA ve proteinlerden ibaret bu parçacıklara bugün ribozomlar denilmekte olup, protein sentezinin burada gerçekleştiği gösterilmiştir.

17.1.a. RNA'nın Yapısı

RNA da aynen DNA gibi uzun ve dallanmamış bir makromolekül olup, nükleotidlerin 3'⟶5' fosfodiester bağlarıyla birleşmesinden teşekkül etmiştir(Şekil 8.2). RNA'daki nükleotidlerin sayısı 75'ten birkaç bine kadar değişmektedir. RNA'nın kovalent yapısı, DNA'dan iki önemli farklılık göstermektedir: (1) İsminden de anlaşılacağı gibi, pentoz birimi deoksiriboz yerine ribozdur, (2) Dört bazından birisi timin yerine urasildir(U). Urasil de timin gibi adeninle komplamenterdir.

Bazı virüslerin dışında bütün canlılarda RNA molekülleri tek zincir yapısındadır. Bunun sonucu olarak da bir RNA molekülünde DNA'larda olduğu gibi, komplamenter bazlar arasında belirli bir oran yoktur. Bununla beraber RNA molekülleri aşağıda gösterildiği şekilde, saç tokası benzeri dönüşlerle ortaya çıkan çift sarmal yapılı bölgeler ihtiva ederler. Bu yapıyı yine bazlar arasındaki spesifik eşleşme sağlar.



Bu bölgelerde A,U ile ve G de C ile eşleşir. G,U ile de hidrojen bağı teşkil edebilir, fakat G-C baz çiftinden daha az kuvvetli olur. RNA saç tokası yapıları genellikle mükemmel değildir, yani karşılık gelen bazlar komplamenter olmayabilir ve tek bir zincir boyunca bir veya daha fazla sayıda baz, diğerlerinin eşleşmesini kolaylaştırmak üzere dışarıya doğru ilmikler meydana getirebilir.

17.1.b. RNA Çeşitleri

Hücrelerde birbirinden farklı üç tip RNA mevcuttur(Tablo 8.4).

1.Messenger veya haberci RNA (mRNA): Protein sentezinde kalıp rolü oynar. Herbir gene veya genler grubuna tekabül eden bir mRNA vardır. Bunun sonucu olarak da mRNA'lar çok heterojen bir makromolekül sınıfını oluşturur. E.coli'de bir mRNA molekülünün ortalama uzunluğu 1200 bazdır.

2.Transfer RNA (tRNA): mRNA kalıbı tarafından tayin edilen sıraya uygun olarak peptid bağı teşkil etmek üzere, amino asitleri aktifleşmiş halde ribozomlara taşımakla görevlidirler. 20 amino asidin herbirisi için en az bir tane tRNA vardır. Ortalama 75 baz ihtiva ettiklerinden RNA'lar içinde en küçük olanlarıdır.

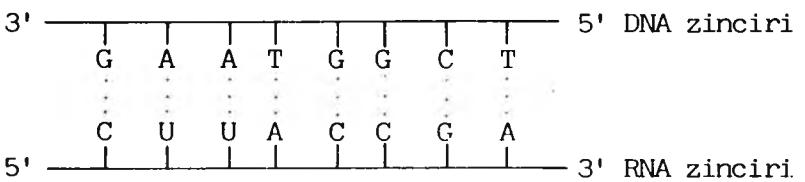
3. Ribozomal RNA: Ribozomların en önemli bileşenleri olup, protein sentezindeki rolleri henüz tam olarak bilinmemektedir.RNA tipleri arasında en bol olanıdır.

Yukarıda kısaca sınıflandırdığımız RNA çeşitlerinin protein sentezindeki rollerini incelerken özelliklerini ve yapılarını da teferruatlı olarak ele alacağız.

17.2. RNA SENTEZİ (TRANSKRİPSİYON)

Haberci RNA kavramı ilk defa 1961 yılında François Jacop ve Jacques Monod tarafından yazılan bir makalede kullanıldı. Ökaryotik hücrelerde proteinler çekirdekte değilde sitoplazmada sentezlenirler. Öyleyse genlerdeki bilgiyi sitoplazmaya taşıyan aracı bileşik ve bu bileşiğin mahiyeti nedir? E.coli'deki protein sentezinin kontrolü üzerinde yapılan çalışmalar bu konuda önemli bir ipucu ortaya çıkardı. Laktozun alım ve kullanımında rol alan bazı enzimlerin hücre içi konsantrasyonları "inducer" adı verilen (izopropiltiyogalaktosit gibi) bileşiklerin

mevcudiyetinde binlerce defa arttı. İnducer ilâvesinden birkaç dakika sonra laktoz enzimlerinin sentezlenme hızı maksimuma ulaşmıştı. İnducerin uzaklaştırılmasıyla, yine aynı süre içinde bu enzimlerin sentezinde durma meydana gelmişti. Bu deneysel buluşlar, bu enzimlerin oluşumu için kararlı kalıpların varlığını kaçınılmaz olarak göstermişti. Bunlar gayet kısa ömürlü haberci RNA (mRNA)'lardan başka bir şey değildir ve nükleus DNA'larının üzerindeki genetik bilgilerin sitoplazmaya taşınma şeklidir. DNA kalıbı tarafından yönetilen mRNA sentezinde oluşturulan mRNA'nın bazlarının kalıp DNA'nınkine komplamenter olduğu, yine 1961 yılında Sol Spiegelman tarafından gösterilmiştir. Yukarıdaki tesbiti sağlayan hibritleştirme deneyleriyle daha sonra, ribozomal ve transfer RNA'ların da DNA kalıpları üzerinde sentezlendiği bulunmuştur.



RNA-DNA komplamenterliği

17.2.a. RNA Polimeraz Enzimi ve Fonksiyonu

mRNA kavramının belirginleşmesinden sonra, DNA tarafından verilen direktiflerle RNA'nın sentezini katalizleyen bir enzim araştırılmaya başlandı. Jerard Hurwitz ve Samuel Weiss kendi laboratuvarlarında birbirlerinden habersiz olarak RNA polimeraz enzimini keşfettiler ve E.coli RNA polimerazının RNA sentezi için aşağıdaki faktörlere ihtiyaç duyduğunu ortaya koydular:

(1) Bir DNA kalıbı. Bu bir DNA çift sarmalı olabildiği gibi, bir DNA zinciri de bu görevi üstlenebilir. Fakat çift sarmalı tercihen kullanır. Çift sarmalı veya tek zincir halinde RNA veya bir DNA-RNA hibridi kalıp görevi yapamaz.

(2) ATP, GTP, UTP ve CTP aktif ön maddelerinin dördü de bulunmalıdır.

(3) Mg^{+2} veya Mn^{+2} gibi iki değerlikli iyonlar.

RNA polimeraz, RNA zincirlerinin başlama ve uzamasını katalizler.Bu enzim tarafından katalizlenen reaksiyonu şöyle yazabiliriz:

$$(RNA)_{n\ rezidü} + NTP \rightleftharpoons (RNA)_{n+1\ rezidü} + PP_i$$

RNA sentezi bazı yönlerden DNA sentezine benzer. Önce sentez yönü 5'——→ 3' şeklindedir. İkincisi nükleotidlerin eklenme mekanizması aynıdır. Uzayan zicnirin 3'-OH grubunun gelen nükleosit trifosfatın en iç taraftaki fosfat grubuna nükleofilik etkileşmesi sonucu ester bağı oluşur. Üçüncü olarak da salıverilen pirofosfatın hidrolizi ile reaksiyon, ürünler lehine kaydırılır.

RNA sentezi aşağıdaki noktalardan da DNA sentezinde farklılık arzeder:

(1) RNA polimeraz bir primere ihtiyaç göstermez.

(2) RNA sentezinde DNA üzerindeki bütün bazlar kopya edildiğinden DNA tamamen korunmuş olur(semikonservatif değil).

(3) RNA polimerazın bilinen hiçbir nükleaz aktivitesi yoktur.

E.colideki bütün RNA çeşitleri (tRNA, mRNA, rRNA) aynı RNA polimeraz enzimi tarafından DNA kalıbına göre sentezlenir. Memeli hücrelerinde ise birbirinden farklı RNA polimeraz enzimleri arasında iş bölümü vardır. Bazı virüs RNA polimerazları bakteri ve yüksek canlı hücrelerindeki gibi DNA'ya bağımlı değil, RNA kalıbına göre RNA sentezini gerçekleştirirler.

Bir DNA çift sarmalı üzerindeki belirli bir gen bölgesine tekabül eden DNA zincirlerinden yalnız bir tanesi transkripsiyona maruz kalır. Fakat RNA kopyası çıkarılan DNA zinciri her gen için aynı değildir. Bir gen, çift sarmalın 1 nolu zincirinden RNA'ya kopya edilirken, bir başka gen de 2 nolu zincirden kopya edilebilir.

E.coliden elde edilen RNA polimeraz, 500 kdal molekül ağırlığında çok büyük ve kompleks bir enzimdir. Derişik üre çözeltisinde iki adet α ile birer adet β, β' ve σ alt birimlerine ayrışır ve $\alpha_2\,\beta\,\beta'\sigma$ formülüyle gösterilir. RNA polimerazın katalitik bölgesi $\alpha_2\beta\beta'$ çekirdeğinde bulunur. β' alt biriminin DNA kalıbına ve β alt biriminin de ribonükleositrifosfat substratlarına bağlandığı gösterilmiştir. Holoenzimin σ alt birimi de transkripsiyonun başlangıç bölgelerinin seçiminde görev alır.

RNA'nın E.coli RNA polimerazı tarafından sentezi üç safhada cereyan eder: (1) Başlama, (2) Uzama, (3) Sonuçlanma.

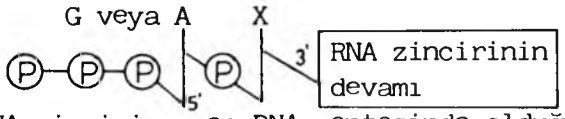
Transkripsiyon, DNA kalıbı üzerinde promoter (başlatıcı) adı verilen spesifik bölgelerde başlar. Araştırmacılar bu bölgelerin yaklaşık 40 baz çiftinden ibaret olduğunu ve DNA üzerinde 140 A°'luk bir uzunluğa tekabül ettiğini göstermiştir. mRNA'nın sentezlenmeye başlandığı bazdan on baz öncesinde yer alan yedi bazdan ibaret bir sıra σ alt birimi tarafından tanınmaktadır. Ayrıca başlangıçtan 35 baz ötede yer alan ikinci bir tanınma bölgesi de ortaya çıkarılmıştır.

Başlangıç için $\alpha_2\beta\beta'\sigma$ holoenzimi gereklidir. σ alt birimi DNA'nın diğer bölgeleri için RNA polimerazın afinitesini 10^4 kadar azaltır. Ayrıca promoter baz sıralamalarının yine bu enzim tarafından tanınmalarını aktive eder. Sigma alt birimi yukarıdaki özelliklerinin yanısıra DNA çift sarmalının açılıp zincirlerden birinin kalıp olarak rol almasını sağlar. Gerçekten RNA polimerazın bağlanmasıyla DNA sarmalının bir dönüşü açılır. Daha son-

ra yeni RNA zincirinin birinci fosfodiester bağı oluşarak ilk safha tamamlanmış olur.

Yeni RNA zinciri başladıktan sonra sigma alt birimi holoenzimden ayrılır. Çekirdek polimeraz ($\alpha_2\beta\beta'$) da DNA kalıbını kopye etmeye devam eder. Böylece holoenzim seçim ve başlangıç rolü oynarken, çekirdek enzimi de uzama işini üstlenir. Ayrışan sigma alt birimi daha sonra diğer bir transkripsiyon devrini başlatmak üzere bir başka çekirdek polimerazına bağlanır.

Yeni sentezlenen bir RNA zincirinin 5' ucunda pppG veya pppA, 3' ucunda ise serbest bir OH grubu vardır.

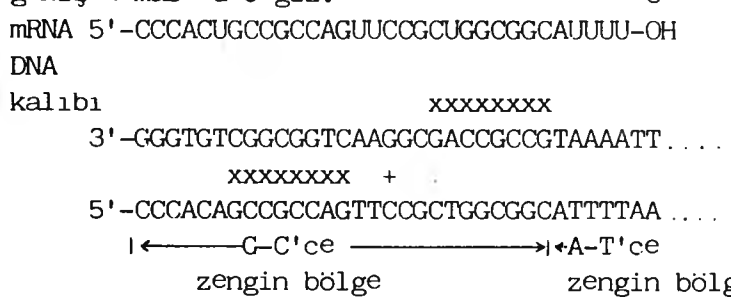


RNA zinciri aynen DNA sentezinde olduğu gibi, 5'→3' yönünde uzar.Bu esnada da RNA polimeraz çekirdeği DNA kalıbı boyunca 3'⟶5' yönünde hareket eder, çünkü kalıp zincir ile yeni sentezlenen RNA zinciri antiparaleldir. Transkripsiyonun tamamı aynı RNA polimeraz enzimi tarafından gerçekleştirilir. DNA'nın kopya edilen bölgesi sarmal konformasyonunu tekrar kazanır ve DNA'nın daha sonraki bölgesi açılır. Maksimum uzama hızı saniyede 50 nükleotiddir.

Daha önceden de temas ettiğimiz gibi, RNA polimeraz nükleaz aktivitesine sahip değildir. Yani DNA polimerazın aksine, sentezlenen polinükleotid zincirini düzeltme kapasitesinden yoksundur.Bunun sonucu olarak da RNA sentezinde hata ihtimali, replikasyondan çok daha fazladır. Yapılan genetik analizler replikasyonda hata oranının kopya edilen 10^{9}-10^{10} baz çiftinden 1 baz çifti olduğunu göstermiştir. RNA sentezinde bu oranın 10^{4}-10^{5}'te bir olduğu gözönüne alınırsa, transkripsiyondaki hata ihtimalinin replikasyondakinin 10^{5} misli olduğu görülmektedir. Bu durum hücre içinde müsamaha görebilir, çünkü bir genin birçok kopyeleri yapılmaktadır.

Transkripsiyonunun sonuçlanması da başlaması gibi kontrol edilmektedir. DNA kalıbı üzerinde yine belirli baz sıralanmalarından oluşmuş "stop" sinyalleri vardır. Bu sinyallerdeki ortak bir özellik sonuçlanma bölgesinde G-C baz çiftlerince zengin bir kısmın A-T'ce zengin bir bölüm tarafından takip edilmesi ve G-C'ce zengin kısımda bir ikili simetrinin bulunmasıdır. Ayrıca sentezlenen RNA zinciri birkaç U rezidüleri ile sonuçlanır ve bu da DNA kalıbı üzerinde A-T'ce zengin bölgedeki A bazları serisi tarafından belirlenir (Şekil 17.1). Yukarıda saydığımız yapısal özelliklerden ibaret sinyallerle RNA polimeraz karşılaştığı zaman nükleotid ilâvesini durdurur. Bu sonlanma noktalarında, başka bir proteine ihtiyaç duyulmadan olgunlaşmış RNA zinciri salıverilir. Bu stop sinyallerinin bulunmadığı başka bölgelerde sonlanma rho proteini adı verilen bir faktör tarafından sağlanır.

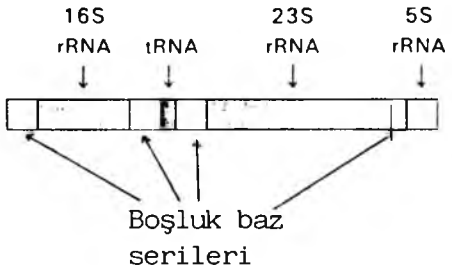
Aslında transkripsiyon olayının, yani genlerdeki bilgilerin proteine dönüştürülmesinin, bir başka deyişle genetik ifadenin (genetic expression) başlangıç ve sonlanması başka faktörler tarafından da denetlenir. Meselâ bir canlı hücrenin, özellikle bakterilerin beslenme ortamındaki değişiklikler, yeni enzim sistemlerinin sentezlenmesini gerektirir. Bu durumda, bu enzimlere karşılık gelen genlerin ifade edilmesinde beslenme ortamını temsil eden bir aracı bileşik başlatıcı rolü oynayacaktır.Bu konuya ileride "operon kavramı" başlığı altında daha geniş temas edeceğiz.



Şekil 17.1. E.coli triptofan sentezleyen enzim sistemi mRNA'sının 3'-OH ucuna karşılık gelen DNA kalıbı baz sıralanışı. İkili simetri noktası (+), bununla ilgili bazlar (x) işaretiyle belirtilmiştir.

17.2.b. RNA'ların Sentez Sonrası Modifikasyonu

Fonksiyonel aktiviteye sahip RNA moleküllerinin teşekkülü, transkripsiyon tamamlandıktan sonra da devam eder. Meselâ prokaryotlarda tRNA ve rRNA molekülleri olgun RNA zincirlerinin parçalanması ve kimyasal modifikasyonu sonucu oluşturulur. E.colideki üç çeşit rRNA ve bir tRNA kopye edilen bir RNA zinciri üzerinde bulunurlar. Bu zincir üzerinde boşluk bölgeleri de vardır.



Bazı RNA zincirleri üzerinde birçok çeşitte veya aynı çeşitte tRNA'lar sıralanmış haldedir. tRNA ve rRNA'nın başlangıç bileşiği olan bu RNA zincirlerini hidrolizleyen nükleazlar son derece yanlışsız ve kesin etkiye sahiptir. Meselâ, E.coli ribonükleaz P enzimi tRNA moleküllerini 5'-ucundan parçalarken, ribonükleaz III, 5S, 16S ve 23S'lik rRNA ön bileşiklerini esas kopye zincirden çift sarmallı saç tokasına benzeyen bölgelerin spesifik noktalarından hidrolizler. Prokaryotlarda tRNA ve rRNA'ların aksine mRNA'lar hemen hemen hiçbir modifikasyona uğramazlar. Gerçekten bir kısım mRNA'lar üzerinde protein sentezlenirken, aynı mRNA'ların transkripsiyonu da devam eder. Bununla beraber bazı virüs mRNA'lar (mesela T7 faj mRNA'sı) protein sentezlenmeden ribonükleaz III tarafından parçalanırlar.

RNA zincirlerinin transkripsiyon ve hatta yukarıda bahsettiğimiz parçalanmalardan sonra maruz kaldığı ikinci modifikasyon da, bazılarının uçlarına nükleotidlerin takılmasıdır. Meselâ tRNA'ların 3'-ucuna CCA nükleotidleri

eklenir. Ökaryotlarda da mRNA'ların 3'-ucuna uzun bir poli A zinciri ve 5'-ucuna da metillenmiş G nükleotidi (cap, yani kapak adı da verilir) ilâve edilir.

Bazların ve riboz birimlerinin modifikasyonu da üçüncü tip değişikliği teşkil eder. Ökaryotlarda rRNA'ların yaklaşık yüz kadar riboz biriminin 2'-OH grubu, S-adenozilmetiyonin tarafından enzimatik yolla metillenir. Bakterilerde ise, riboz birimlerinden ziyade bazlar metilasyona maruz kalırlar. Özellikle bütün tRNA'larda bulunan anormal bazlar bu yolla teşekkül eder. Meselâ psödöüridilat ve ribotimidilat, üridilat rezidülerinin transkripsiyondan sonra modifikasyonları sonucu meydana gelmektedir.

Ökaryotlarda bütün RNA kopyeleri ileri derecede modifikasyona maruz kalırlar. rRNA ve tRNA başlangıç zincirleri prokaryotlardakine benzer parçalanma ve değişmelere uğrarlar. Ökaryot mRNA'lardaki en büyük fark, bu moleküllerin çok daha uzun kopyelerin parçalanıp bölünmesiyle hasıl olmalarıdır. Ökaryotlarda transkripsiyon ve translasyon hücrenin farklı bölmelerinde husule gelir. Muhtemelen RNA bünyesinde meydana gelen modifikasyonlar, mRNA ve tRNA'ların nükleustan sitozole taşınmalarını düzenlemede önemli bir rol oynamaktadır.

17.2.c. Ökaryotik RNA Polimeraz Enzimleri

Ökaryotik hücrelerde RNA'lar üç çeşit RNA polimeraz enzimi tarafından sentezlenir. Bu enzimler kalıp spesifikliği, hücre içi dağılımı ve inhibitörlere cevabı noktalarından farklılık gösterir. RNA polimeraz I, nükleolde bulunur ve 5,8S, 18S ve 28S'lik ribozomal RNA'ların karşılığı olan genleri kopye eder. 5S rRNA'yı ve diğer bütün tRNA'ları nükleoplazmada bulunan RNA polimeraz III sentezler. mRNA'ların ön bileşikleri olan büyük uzun RNA zincirleri ise, yine nükleoplazmada yer alan RNA polimeraz II tarafından sentezlenir. Prokaryotlarda bütün RNA çeşitlerinin tek bir RNA polimeraz enzimi tarafından sen-

tezlendiğini görmüştük. Ökaryotik RNA polimerazların hepsi de iki büyük ve birkaç küçük alt birimlerden ibarettir.

Burada RNA polimeraz II'nin önemli bir inhibitöründen bahsetmeden geçemiyeceğiz. Memleketimizde her yıl yüze yakın kişinin ölümüne sebep olan mantar zehirlenmesine yol açan toksinlerden birisi ve en önemlisi α-amanitin'dir. Anormal amino asitlerin oluşturduğu siklik bir oktapeptid olan α-amanitin, RNA polimeraz II'ye çok sıkı şekilde ($K=10^{-8}$ M) bağlanır ve mRNA sentezini bloke eder. Polimeraz III ise daha yüksek konsantrasyonlarda (10^{-6} M) inhibe edilirken, polimeraz I bu toksine cevap vermez.

17.2.d. Ökaryotik mRNA'ların Sentezi ve Özellikleri

Ökaryotlarda rRNA ve tRNA'ların prokaryotlardakine benzer şekilde teşekkül ettiğini önceden belirtmiştik. Bunların aksine prokaryotik ve ökaryotik mRNA'lar arasında, hem sentez hem de yapı yönünden bazı farklılıklar vardır. Bunları şöyle sıralayabiliriz:

1. Ökaryotlarda primer kopyeler doğrudan doğruya mRNA olarak kullanılamazlar. Nükleustan sitozole geçmeden önce bazı modifikasyonlara uğrarlar. Prokaryotların aksine, ökaryotlardaki translasyon ve transkripsiyon hem hücre içi yerleşiminden, hem de yukarıda bahsettiğimiz modifikasyondan dolayı birbirinden tam ayrı olarak cereyan ederler.

2. Ökaryotlardaki primer kopyelerin büyüklüğü 2000 ile 20.000 baz arasında değişir ve bunlara heterojen nükleer RNA'lar (hnRNA) adı verilir. Bunlar kendilerinden türetilen mRNA'lardan birçok defalar daha uzundur. Ökaryotik mRNA'ların husulü, birçok bölünme ve parçalanmalarla vuku bulur.

3. Ökaryotik mRNA'lar 5' uçlarında modifiye edilmiş nükleotid "cap"ler ihtiva ederler. 3' uçlarında da çok defa poli A kuyrukları takılıdır.

4. Ökaryotik mRNA'lar monosistroniktir, yani yalnız birtek polipeptid zinciri için kalıp vazifesi görür. Prokaryotik mRNA'lar ise, polisistroniktir (meselâ lac-mRNA üç polipeptid zincirine kalıplık yapar).

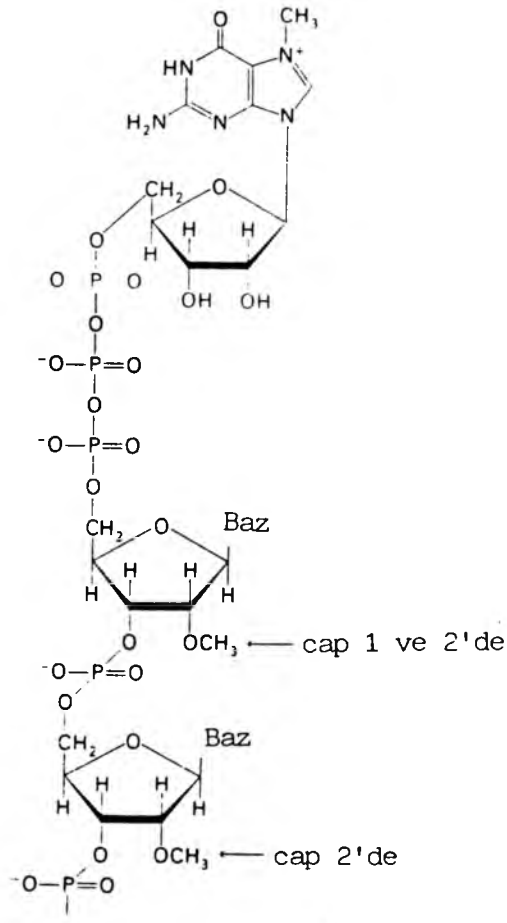
5. Bir ökaryotik hücrede mRNA moleküllerinin sayısı yalnızca belirli genlerin transkripsiyon hızlarına değil, aynı zamanda hnRNA'nın yıkılıp atılması veya olgun mRNA'lara çevrilip sitozole taşınmasına da bağlıdır.

Yukarıda da bahsedildiği gibi, bütün bilinen ökaryotik mRNA'lar 5'ucundan modifikasyona uğramışlardır. 7-Metil guanozin, mRNA ile genelde pek rastlanmayan bir 5'-5'-pirofosfat bağı vasıtasıyla birleşmiştir. "Cap" adı verilen bu çok değişik yapı ilk kopye (hnRNA) tarafından kazanılır. Zincirin 5'-trifosfat ucu önce difosfata hidrolizlenir ve sonra GTP'den bir GMP grubu bu uca aktarılır. Daha sonra bu guaninin N-7 azotu, S-adenozilmetiyonin tarafından metillenerek "cap 0"'ı oluşturur. Komşu ribozlar da metilasyona maruz kalabilir ve bu durumda "cap 1" ve "cap 2" meydana gelir(Şekil 17.2). Bu "cap" yapıları 5' uçlarını nükleazlar ve fosfatazlar etkisinden koruyarak mRNA'ların kararlılığını artırır. Ayrıca ökaryotik protein sentezleyen sistemler tarafından mRNA'ların translasyonlarını da teşvik eder.

Ökaryotik mRNA'ların birçoğunun 3' uçlarında poli A kuyrukları takılıdır. Bir poli A polimeraz enzimi, 3' ucunda GC veya uçtan yaklaşık 20 rezidü iç tarafta bir AAUAA sırası ihtiva eden mRNA'lara 150 ila 200 nükleotid ilâve eder. Poli A kuyruğu translasyon için gerekli olmamasına rağmen mRNA'nın kararlılığını artırır.

17.3. GENETİK ŞİFRE VE GEN-PROTEİN İLİŞKİLERİ

Genetik şifre DNA'daki baz sırası (veya mRNA kopyesindeki) ile bir proteinin amino asit sırası arasındaki münasebeti gösterir. Şifre bütün canlılarda aynıdır. Kodon adı verilen üç baz, bir amino asidi belirler. Bu kodonlar sırasıyla tRNA molekülleri tarafından okunur. Genetik şifrenin 1960'larda aydınlatılmasıyla modern biyolojide büyük bir merhale katedilmiştir.



Şekil 17.2. Ökaryotik mRNA'ların 5'-ucundaki "cap" lerin yapısı. Bütün "cap"ler 5'-ucunda bir pirofosfat bağı üzerinden 7-metilguanilat ihtiva ederler. Cap 0'da metillenmiş riboz bulunmazken, cap 1'de bir ve cap 2'de iki riboz metillenmiştir.

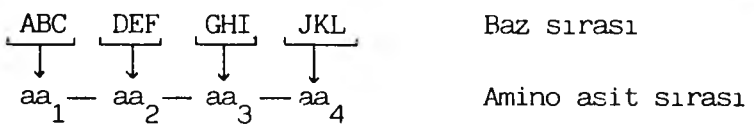
17.3.a. Genetik Şifre ve Bazı Özellikleri

Francis Crick, Sydney Brenner ve diğer araştırmacılar yaptıkları deneylerin sonucu olarak genetik şifrenin bazı özelliklerini 1961 yılında şöyle sıralamışlardır:

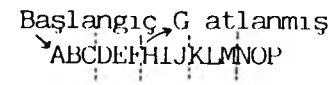
1. Bir amino asidin şifrelenmesinde üç bazdan ibaret bir grup görev yapar. Eğer tek bazdan ibaret olsaydı,

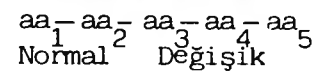
yalnız dört amino asit, iki bazdan ibaret olsaydı 16 çeşit amino asit (4x4=16) şifrelenmiş olacaktı. Üç baz sırasından ise 64 çeşit (4x4x4=64) şifre olabilir. Proteinler yirmi çeşit amino asit ihtiva ettiğine göre bir amino asit için birden fazla şifre vardır. Gerçekten, daha sonradan yapılan araştırmalar 64 baz tripletinden (üçlüsünden) 61'inin amino asitleri belirlediğini, iki amino asidin dışında diğerlerinin birden fazla triplet tarafından şifrelendiğini göstermiştir.

2. Genetik şifre (genetic code)'de tripletler üst-üste gelmeyen (nonoverlapping) şekildedir. Yani ABCDEF-GHIJKL ile gösterilen baz sıralamasında tripletler ABC, BCD, CDE v.s. şeklinde değil, bilakis her üçlü grup bir amino asidi kodlamaktadır.

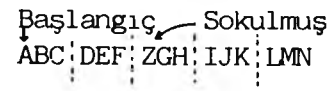


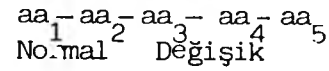
3. Baz sıraları, sabit bir noktadan başlanarak okunur. Eğer, meselâ G bazı atlanmışsa (deletion) ondan sonra gelen amino asitler değişik ve yanlış belirlenir.





Eğer F ve G arasında Z bazı sokulmuşsa (insertion) baz dizilişi de





şeklinde Z'nin dahil olduğu tripletten itibaren yanlış, yani değişik okunur.

Şimdi 61 kodonun da hangi amino aside tekabül ettiği bilinmektedir ve geri kalan üç kodonun da "stop" sinyali olduğu ortaya çıkarılmıştır. Aşağıda kodon-amino asit ilişkisini gösteren genetik şifre tablosu verilmiştir (Tablo 17.1).

Tablo 17.1. Genetik şifre.

1.pozisyon (5'-ucu)	İkinci pozisyon				3.pozisyon (3'-ucu)
	U	C	A	G	
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
	Leu	Ser	Stop	Stop	A
	Leu	Ser	Stop	Trp	G
C	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	Gln	Arg	A
	Leu	Pro	Gln	Arg	G
A	Ile	Thr	Asn	Ser	U
	Ile	Thr	Asn	Ser	C
	Ile	Thr	Lys	Arg	A
	Met	Thr	Lys	Arg	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	U
	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val	Ala	Glu	Gly	G

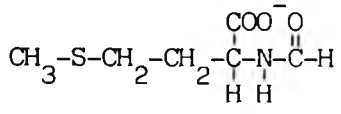
Tablodan görüldüğü gibi, amino asitlerin birçoğu birden fazla triplet ile gösterilmektedir. Yalnız metiyonin ve triptofan birer triplet ile kodlanmıştır. Geride kalan 18'i, iki veya daha fazla sayıda şifreye sahiptir. Meselâ lösin, arginin ve serin altışar kodon tarafından temsil edilir. Normal fizyolojik şartlarda bir kodon yalnız bir amino asidi gösterir.

Aynı amino asidi belirleyen kodonlara eşanlamlı (synonym) denir.Meselâ CAU ve CAC, histidin için eş anlamlı kodonlardır. Eş anlamlı kodonların genetik şifre tablosunda yayılmış halde olmadığı,bilâkis bir amino asidi gösteren iki veya daha fazla sayıdaki (dördü geçmemek şartıyla) kodonların birtek kutu içinde yer aldığı görülmektedir. Bir kutu içindeki amino asitlere karşılık gelen

kodonların ilk iki bazı aynı olup, GUU, GUC, GUA ve GUG örneğinde görüldüğü gibi, üçüncü bazları farklıdır. Yani çoğu eş anlamlı kodonlarda tripletin yalnız son bazları değişiktir. Yine genetik şifreye göre, bir kutu içindeki XYC ve XYU daima aynı amino asidi, XYA ve XYG ise, yine daima bir başka amino asidi kodlamaktadır.

Acaba genetik şifrenin bu derece dejenere olmasının (yani bir amino asidin birden fazla kodon tarafından şifrelenmesinin) biyolojik önemi nedir? Bu dejenerasyonun muhtemelen en büyük faydası ve önemi, mutasyonların tahrib edici tesirini asgariye indirmesidir. Bir başka yararı da DNA tarafından şifrelenen proteinlerdeki amino asit sırasını değiştirmeden DNA baz bileşiminin büyük ölçüde farklı olmasını mümkün kılabilmesidir. Bakterilerde [G]+ [C] muhtevası, % 30'dan % 70'i aşan bir aralıkta değişir. Birbirinden oldukça farklı [G]+ [C] bileşimlerine sahip DNA molekülleri, eğer farklı eş anlamlı kodonlar kullanılırsa, aynı çeşit proteini şifreleyebilir.

UAA, UAG ve UGA kodonları zincir sonlanmasını şifrelerler. Bu kodonlar tRNA'lar tarafından okunamamakla beraber, salıverme faktörleri (releasing factors) adı verilen spesifik proteinler tarafından teşhis edilerek protein sentezine son verilir. Protein sentezindeki başlangıç sinyalleri daha karmaşıktır. Bakterilerdeki polipeptid zincirleri modifiye bir amino asit olan formilmetiyonin (fMet) ile başlar.



Formil metiyonin

fMet'i taşıyan spesifik bir tRNA vardır. Bu fMet-tRNA, AUG (bazen GUG) kodonunu tanır.Bununla beraber AUG aynı zamanda polipeptid zincirinin iç taraflarına yerleşecek olan metiyonini, GUG de valini şifreler. Bu poli-

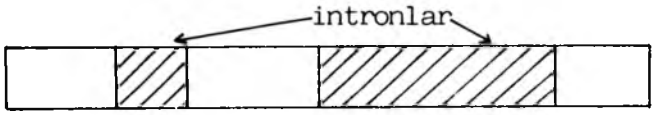
peptid zincirindeki ilk amino asit sinyalinin diğerlerine nazaran daha kompleks olması gerektiği manasına gelmektedir. Böylece AUG (veya GUG) başlangıç sinyalinin bir bölümünü teşkil etmektedir ve metiyonin ile valin sinyallerinden ayırdedilmesini sağlayan başka faktörlerin de olması gerekmektedir.

Virüsler, bakteriler ve ökaryotik organizmalardaki mutasyonların analizleri sonucu genetik şifrenin bütün canlı organizmalar için geçerli olduğu tesbit edilmiştir. Bu da bütün canlıların tek bir elden yaratıldığının güzel bir delilidir.

17.3.b. Gen-Protein İlişkileri

Hem DNA hem de polipeptid zincirlerinin dallanmamış yapılara sahip olmaları, genlerle proteinler arasında lineer bir karşılık gelme olabileceği fikrini vermişti. Charles Yanofsky E.coli mutantları üzerindeki çalışmalarında, genetik haritalar üzerindeki mutasyona uğrayan baz sıralarının polipeptid zincirleri üzerindeki amino asitlerin yine aynı sırada değiştirdiğini keşfetti. Bu da genlerin ve ürünleri olan proteinlerin kolineer olduklarını ortaya koymaktadır.

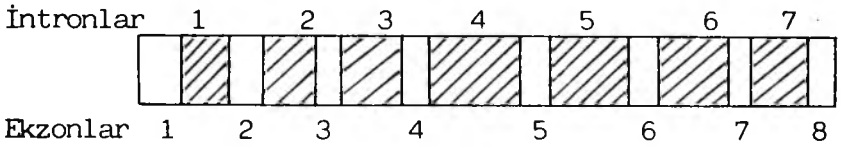
Bakterilerde polipeptid zincirleri DNA üzerinde birbirini takip eden triplet kodonlarının kesiksiz sırası tarafından şifrelenir. Uzun süre ökaryotlarda da genlerin kesiksiz olduğu sanılmıştı. 1977 yılında muhtelif laboratuvarlarda yapılan araştırmalar bazı genlerin kesikli olduğunu göstermiştir. Meselâ hemoglobinin β-zinciri geni, amino asit sıralamasını şifrelemeyen biri 550, diğeri 120 baz çiftine sahip olan ara sıralanışlarıyla üç parçaya ayrılmıştır:



β-Globin geni

Bu tip genlerde protein zinciri şifreleyen gen parçalarına ekzon, şifrelemede rol almayan ara sıralanışlara da intron adı verilir.

Üzerinde çalışılan parçalanmış genlerden birisi de tavuk ovalbümin proteinine aittir. Bu proteinin geni, yedi uzun intron ile birbirinden ayrılan sekiz ekzondan ibarettir.



Bu parçalanmış genler de ürünleri olan proteinlerle kolineerdir. Şimdiye kadar incelenen bütün deniz hayvanları ve memeli genlerinin, histon genleri hariç, parçalanmış olduğu gösterilmiştir.

17.3.c. Mutasyon Çeşitleri

Mutasyon, DNA baz dizilişinde meydana gelen değişmelerdir. Başlıca üç çeşit mutasyon vardır:

1. Bir veya daha fazla sayıda baz çiftinin başka bazlarla yer değiştirmesi (sübstitüsyon),
2. Bir veya daha fazla baz çiftinin atlanması (deletion),
3. Bir veya daha fazla baz çiftinin DNA zinciri içine sokulması (insertion).

En sık rastlanan mutasyon tipi sübstitüsyondur. T4 bakteriyofajı,E.coli ve Drosophila melanogaster'de tahmin

edilen kendiliğinden mutasyon, bir replikasyonda baz başına sırasıyla $1,7x10^{-8}$, $4x10^{-10}$ ve $7x10^{-11}$'dir.

Bir pürin bazının bir başka pürinle veya bir pirimidin bazının bir başka pirimidinle yer değiştirmesine transition denilir. Eğer sübstitüsyon pürinle pirimidin arasında vuku bulursa bu mutasyona transversion adı verilir. Bazı mutant E.coli'lerde bozuk DNA polimeraz enzimlerinin de mutasyona sebebiyet verdiği gözlenmiştir.

17.3.d. Mitokondri ve Kloroplastlardaki Genetik Bilgi

Ökaryotik hücrelerdeki genetik bilginin tamamı, nükleustaki kromozomal DNA tarafından taşınmamaktadır. Maya hücreleri üzerinde yapılan genetik çalışmalar, nükleustakinden ayrı olarak mitokondrilerde de genetik bilgi bulunduğunu göstermiştir. 1949 yılında Boris Ephrussi, bazı hamur mayası mutantlarının oksidatif fosforilasyon yapamadıklarını gözledi. Yapılan genetik analizler sürpriz bir buluşla sonuçlandı. Oksidatif fosforilasyonu yapamamalarına sebep olan mutasyonlar nükleustan bağımsız ve ayrı halde idi ve mitokondrilerin kendi genlerine sahip olduklarını göstermekde idi. Birkaç yıl sonra mitokondrilerin, ondan daha sonra da fotosentetik hücre kloroplastlarının replikasyon, transkripsiyon ve translasyona uğrayabilen DNA ihtiva ettikleri kesin olarak ortaya konuldu.

Hayvan hücrelerinden elde edilen mitokondri DNA molekülleri yaklaşık 5 mikrometre uzunlukta (yaklaşık 15.000 baz çifti) ve dairesel kapalı bir çift sarmal yapıdadır. Maya mitokondri DNA'sı bunun takriben beş katı, kloroplast DNA'sı ise on katı uzunluktadır. Mitokondri ve kloroplast DNA molekülleri, nükleer DNA'da olduğu gibi, histon proteinleri ile birleşik değildir. Nisbeten küçük olup, büyüklükçe viral genomlara benzemektedirler. Üzerinde en çok çalışılmış olan mitokondri genomu mayanınkidir. Bu genomun yaklaşık on protein, iki rRNA ve 26 çeşit tRNA şifrelediği bulunmuştur. Mitokondri DNA'sı tarafın-

dan belirlenen ve yine bu organel içinde sentezlenen proteinler, toplam mitokondri proteinlerinin % 5'ini teşkil etmektedir. Yani mitokondri proteinlerinin % 95'i nükleus tarafından şifrelenmektedir. Bununla beraber mitokondrinin genetik katkısı vazgeçilmez ve hücre için son derece lüzumlu bir hususdur. Meselâ sitokrom oksidazın yedi alt biriminden üçü ve iç mitokondri zarında bulunan ATPaz enziminin on alt biriminden üçü mitokondri genomu tarafından şifrelenmektedir. Ayrı ayrı genomların mevcudiyeti, ortaya bazı özel problemler çıkarmaktadır. Mitokondri DNA'sının replikasyonu, kromozom düplikasyonu ve hücre bölünmesiyle nasıl koordineli gerçekleşmektedir? Sitozolde sentezlenen proteinler mitokondri içine nasıl girmekte ve nasıl mitokondri proteinleriyle birleşmektedir? En önemli soru da, niçin mitokondriler, proteinlerinin % 95'i nükleer genler tarafından şifrelendiği halde, kendileri de ayrı genlere sahiptir? Bugün bu soruların cevapları henüz bilinmemektedir.

17.4. PROTEİN SENTEZİ VE KONTROL MEKANİZMASI

Bir protein üzerindeki amino asit dizilişinin mRNA üzerindeki kodonların sıralanışı ile belirlendiğini daha önceden göstermiştik. Şimdi translasyon adı verdiğimiz protein sentezini izah edeceğiz. Translasyonun kelime manası tercüme (çeviri) demektir. Gerçekten mRNA'lar üzerindeki bazlar kelimeleriyle ifade edilen bilgi, amino asitlerden ibaret proteinlere tercüme edilmektedir. Translasyon, hem replikasyon hem de transkripsiyondan daha kompleks bir işlemdir. Bu iş için yaklaşık yüz çeşit makromolekül koordineli olarak görev alır. Bu makromoleküller arasında ribozomların yanısıra, tRNA'ları aktifleştirici enzimleri, protein yapısında çözünmüş birtakım faktörleri ve mRNA'yı sayabiliriz.

Protein sentezini detaylı olarak incelemeden önce, tamamını kısaca özetleyelim: Bir protein, peptid zincirinin karboksil ucuna sırayla amino asitlerin eklenmesi sonucu, amino ——→ karboksil yönünde sentezlenir. Aktif-

leşmiş ön bileşik olarak aminoaçil-tRNA'lar rol alır. Bu aminoaçil-tRNA'larda amino asitlerin karboksil grubu tRNA'nın 3' ucunu bağlanmıştır. Bu bağlanma yağ asitlerinin aktifleşmesine benzer şekilde aminoaçil-tRNA sentetaz enzimi katalizörlüğünde ATP harcanarak gerçekleştirilir. Protein sentezinde üç safha vardır: (1) Başlangıç, (2) Uzama, (3) Sonlanma.

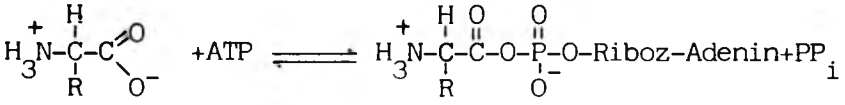
Başlangıç, başlatıcı tRNA'nın mRNA üzerindeki başlama sinyaline bağlanmasıyla gerçekleşir. Bu tRNA ribozom üzerindeki P (peptidil) kısmını işgal eder. Uzama, aminoaçil-tRNA'nın ribozom üzerindeki ikinci tRNA bağlanma bölgesi olan A bölgesini (amino açil bölgesi) işgaliyle başlar. Daha sonra gelen aminoaçil-tRNA'nın amino grubuyla, başlatıcı tRNA tarafından taşınan fMet'in karboksil grubu arasında bir peptid bağı teşekkül eder. Oluşan dipeptidil tRNA ribozomun A bölgesinden P bölgesine yer değiştirir ve diğer tRNA ribozomdan ayrılır. Bu arada mRNA da müteakip kodonu bağlanmaya hazırlamak için üç baz ilerler. Bu işlem esnasında da bir GTP harcanır. Boş olan A bölgesine bir başka aminoaçil-tRNA bağlanarak yukarıda anlatıldığı şekilde uzamanın bir başka devri başlar. Sonlanma safhası mRNA üzerindeki durma sinyalinin bir protein salıverme faktörü tarafından okunup, tamamlanmış olan polipeptid zincirinin ribozomdan salıverilmesiyle gerçekleşir. Bu kısımda anlatacağımız protein sentezi, bu olayın en çok çalışıldığı E.coli bakterisininki olacaktır. Yeri geldiğinde prokaryotik ve ökaryotik protein sentezleri arasındaki farklılıklar da izah edilecektir.

17.4.a. Amino Asitlerin Aktifleştirilmesi

Bir amino asidin amino grubu ile diğerinin karboksil grubu arasında bir peptid bağının teşekkülünün ΔG° değeri pozitiftir. Bu termodinamik engel ilâve edilecek amino asitlerin karboksil gruplarının aktifleştirilmesiyle aşılır. Aktifleştirme, amino asidin karboksil grubunun, tRNA'nın 3' ucundaki riboz biriminin 2' ve 3'-hidroksili ile ester bağı yapması sonucu gerçekleşir. Bu aktifleşmiş ara bileşiğe aminoaçil-tRNA adı verilir.

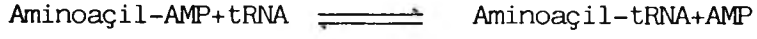
Aminoaçil-tRNA ara bileşiğinin teşekkülü, aktifleşmiş karboksil grubu sağlamanın yanısıra mRNA üzerindeki kodonları tanıyabilecek bir bileşiğe (tRNA) amino asidi bağlamış oluyor. Çünkü amino asitler kendilerine tekabül eden kodonları teşhis edemezler.

1957 yılında Paul Zamecnik ve Mahlon Hoagland, amino asitleri aktifleştirip tRNA'lara bağlanmalarını katalizleyen aminoaçil-tRNA sentetaz aktifleştirici enzimleri keşfettiler. Bazı sentetazlar, ilk basamakta bir amino asit ve ATP'den karışık bir anhidrit olan aminoaçil-adenilat oluştururlar. Diğer sentetazlarda, ATP, amino asit ve tRNA arasındaki reaksiyon esnasında amino açil-adenilat ara bileşiğine rastlanmamıştır.



Aminoaçil adenilat
(Aminoaçil-AMP)

Bundan sonraki basamakta da aminoaçil grubu bu amino aside tekabül eden tRNA'ya transfer edilir.



Bu aktifleştirme ve transfer reaksiyonlarının toplamını yazarsak,

ürünler kısmında bir pirofosfat ortaya çıkar ve bunun da hidroliziyle aminoaçil-tRNA'nın oluşması reaksiyonu oldukça ekzergonik hale dönüşür. Böylece bir aminoaçil-tRNA'nın sentezinde iki yüksek enerjili fosfat bağı tüketilmiş olur.

Herhangi bir amino asit için aktifleştirme ve

transfer basamakları, aynı aminoaçil-tRNA sentetaz enzimi tarafından katalizlenir. Aminoaçil-AMP ara bileşiği sentetazdan ayrışmadan transfer edilir.

Yağ asitlerinin aktifleştirilmelerinde gördüğümüz açil-adenilat ara bileşiği de aminoaçil-tRNA'ya benzemektedir. Bunların teşekkül reaksiyonlarındaki başta gelen farklılık, açil grubu alıcısı olarak birisinde CoA, diğerinde tRNA'nın görev yapmasıdır.

Her amino asit için en az bir aminoaçil-tRNA sentetaz enzimi vardır. Bu enzimlerin büyüklükleri, alt birimlerin yapıları ve amino asit bileşimleri farklıdır(Tablo 17.2).

Tablo 17.2. Bazı amino açil-tRNA sentetazların özellikleri.

Kaynak	Amino asit substratı	Kütle (kdal)	Alt birim yapısı
E.coli	His	85	α_2
E.coli	Ile	114	tek zincir
E.coli	Lys	104	α_2
E.coli	Gly	227	$\alpha_2\beta_2$
Maya	Lys	138	α_2
Maya	Phe	270	$\alpha_2\beta_2$
Sığır pankreası	Trp	108	α_2

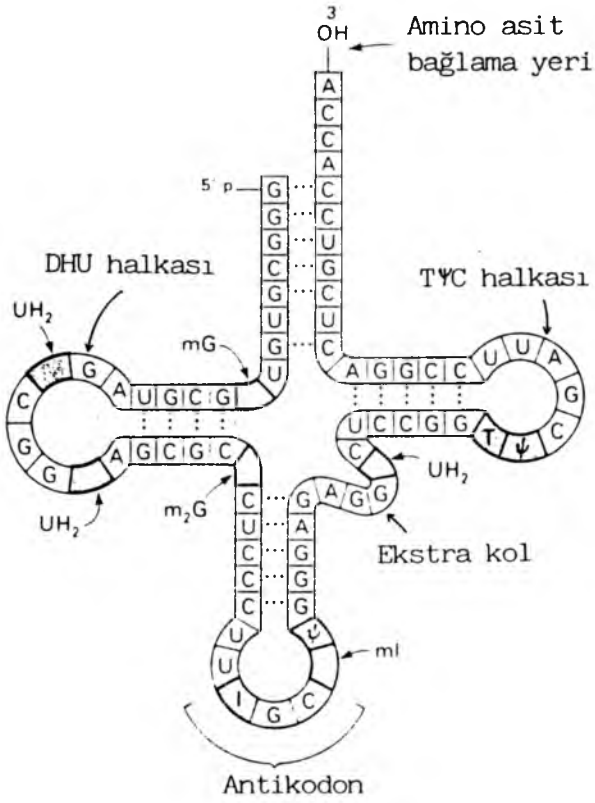
Genetik bilginin doğru olarak translasyonu, aminoaçil-tRNA sentetazların ileri derecedeki spesifikliğinden kaynaklanmaktadır. Bu enzimler aktifleştirilecek amino asitleri ve bunlara karşılık gelen tRNA'ları teşhis etmede oldukça seçicidirler. Farklı amino asitlere ait tRNA'lar farklı baz dizilişlerine sahip olduklarından sentetazlar tarafından kolayca teşhis edilebilirler. Birbirine

benzeyen amino asitleri ayırdetmek çok daha zor bir iştir. Meselâ, izolösin ile valin arasındaki fark bir metilen grubudur. Bu yüzden izolösin sentetazına valinin bağlanarak aktifleştirilmesi ihtimali yüksektir. Böyle bir durumda aktifleşmiş valin, izolösine spesifk tRNA'ya aktarılmaz ve tRNA'nın da yardımıyla sentetaz tarafından hidrolizlenir. Böylece yanlış bir amino asidin proteine girmesi engellenmiş olur. Diğer bazı aminoaçil-tRNA sentetaz enzimleri de sentez bölgelerinin yanısıra hidrolizleyici bölgelerde ihtiva ederler.

17.4.b. Transfer RNA'nın Yapısı

Bir tRNA molekülünün baz dizilişi ilk defa 1965 yılında yedi seneyi aşan çalışmalar sonucu, Robert Holley tarafından tayin edildi. Maya alanin tRNA'sı üzerindeki bu çalışmayla ilk defa bir nükleik asidin tüm baz dizilişi tesbit edilmiş oluyordu. Şekil 17.3'de baz dizilişi tam olarak verilen maya alanin tRNA molekülü 77 ribonükleotidden ibaret bir zincirdir. Molekülün en önemli özelliği A,U,G ve C bazlarının yanısıra yüksek oranda anormal bazları da ihtiva etmesidir. Bu tRNA'da dokuz çeşit anormal baz vardır: inozin, psödöüridin, dihidroüridin, ribotimidin ve guanin ile inozinin metillenmiş türevleri. Molekülün 5' ucunda fosforillenmiş G, 3' ucunda ise amino asitlerin bağlandığı serbest OH vardır. tRNA'nın orta kısmında yer alan IGC dizilişi antikodon olup, mRNA üzerinde alaninin kodonu olan GCC'ye komplamenterdir.

Kısa süre içerisinde başlıca tRNA'ların da baz dizilişi tesbit edildi. Bugün yirmiden fazlasının baz dizilişi bilinmektedir. Bazlarının yarısına yakını eşleşmiş olan bu moleküllerin şekli bir yonca yaprağını andırmaktadır. Bütün tRNA moleküllerinin ortak yapısal özellikleri vardır. Bu beklenmeyen bir sonuç değildir, çünkü bütün tRNA'ların ribozomlar ve mRNA'lar ile etkileşmeleri yaklaşık aynı şekilde olmaktadır. Özellikle hepsi de ribozomlar üzerindeki A ve P bölgelerine uygunluk göstermekte ve peptid bağı oluşumunu katalizleyen enzimle etkileşebilmektedir.



Şekil 17.3. Maya alanin tRNA'sının baz dizilişi. Modifiye bazlar kısaca; inozin (I), metilinozin (mI), dihidroüridin (UH_2), ribotimidin (T), psödöüridin (Ψ), metilguanozin (mG) ve dimetilguanozin(m_2G).

Bütün transfer RNA moleküllerinde aşağıdaki ortak yapısal özellikler vardır.

1. 73 ile 93 ribonükleotid (yaklaşık 75 kdal) biriminden ibaret tek zincir halindedirler.

2. Molekül başına 7 ile 15 arasında anormal baz ihtiva ederler. Bunların çoğu A,U,C ve G'nin tRNA sentezlendikten sonra enzimatik modifikasyonunda oluşan bir veya iki metilli türevleridir. Bu anormal bazların rolü henüz bilinmemektedir. Muhtemelen bazı bazların arzu edilmeyen etkileşmelerini önleyerek baz eşleşmelerini engellemektedir. Ayrıca metilasyonla tRNA'ların bazı bölgeleri

hidrofobik karakter kazanmakta ve bu da tRNA'ların sentetazlar ve ribozomal proteinlerle etkileşmelerinde önemli olmaktadır.

3. tRNA'ların 5' uçları fosforillenmiştir ve çok defa pG rezidüsü tarafından işgal edilmiştir.

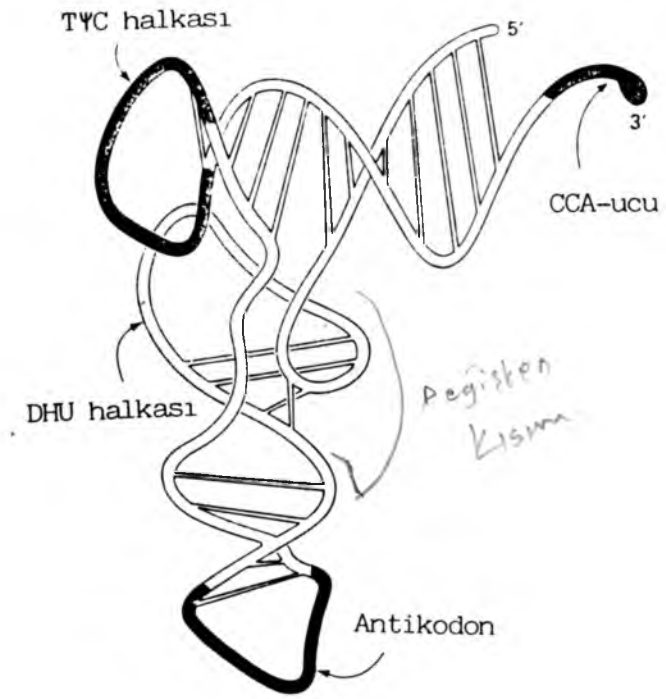
4. tRNA'ların 3'ucundaki baz sıralanışı CCA şeklindedir. Aktifleşmiş amino asit, uçtaki adenozinin 3'-OH grubuna bağlanır.

5. tRNA'lardaki nükleotidlerin yaklaşık yarısı çift sarmal teşkil edecek şekilde eşleşmişlerdir. Beş adet baz grubunda eşleşme görülmez: 3' ucundaki CCA; adını ribotimin, psödöurasil, sitozin dizilişinden alan TΨC çıkıntısı; değişik sayıda rezidü ihtiva eden "ekstra kol", muhtelif dihidrourasil rezidülerinden ibaret DHU çıkıntısı ve son olarak da antikodon çıkıntısı.

6. Antikodon çıkıntısı aşağıda gösterilen sırayla dizilmiş yedi bazdan ibarettir.

5'-Pirimidin-Pirimidin-X-Y-Z- Modifiye-Değişken-3'
pürin baz
Antikodon

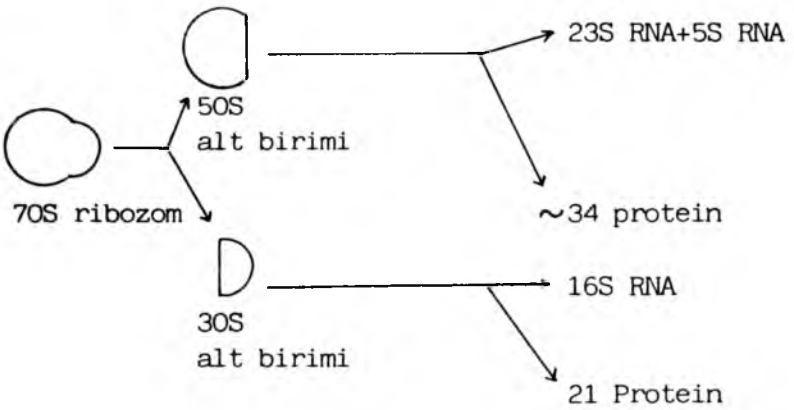
Son yıllarda, Alexander Rich ve Aaron Klug adlı bilim adamlarının maya fenilalanin tRNA'sı üzerinde yaptıkları X-ışınları kristallografisi incelemeleri sonucu tRNA'ların üç boyutlu yapıları hakkında geniş bilgi elde edilmiştir. Özetle bu moleküllerin L-şeklinde olduğu, iki çift sarmal bölgesinin bulunduğu, sarmal yapısı dışında molekülün tersiyer yapısını oluşturan hidrojen bağlarının mevcut olduğu, CCA terminalinin L'nin bir ucunda, antikodunun ise diğer ucunda yer alıp, DHU ve TΨC çıkıntılarının L'nin köşelerini işgal ettikleri ortaya çıkarmışlardır(Şekil 17.4).



Şekil 17.4. Maya fenilalanin tRNA'sının üç boyutlu yapısının şematik gösterilişi.

17.4.c. Prokaryotik ve Ökaryotik Ribozomlar

Ribozomlar, protein sentezinin vuku bulduğu organellerdir. Yaklaşık 200 A° çapında, çok özelleşmiş ve karmaşık yapıdadırlar. Üzerinde en çok çalışılmış olan ribozomlar, E.coli'ninkilerdir. 2500 kdal'luk bir kütleye ve 70S'lik bir sedimentasyon katsayısına sahip olup, 50S ve 30S'lik, büyük ve küçük alt birimlere ayrışabilir. 30S alt birimi 21 protein 16S'lik RNA, 50S alt birimi ise, 34 proteinin yanısıra 23S ve 5S'lik iki çeşit RNA ihtiva eder. Bir E.coli ribozomu kütlesinin yaklaşık 2/3'ünü RNA, 1/3'ünü de protein teşkil eder:



Ökaryotik hücre sitoplazmalarında bulunan ribozomlar, bakterilerinkinden biraz daha büyüktür ve 80S'lik bir sedimentasyon katsayısına sahiptir. Bakteri ribozomlarında olduğu gibi, bir büyük (60S) ve bir de küçük (40S) iki alt birime ayrışır. 40S'lik alt birim, bir 18S RNA ile 30 kadar protein, 60S'lik alt birim ise, 5S, 5,8S ve 28S'lik üç RNA molekülü ile yaklaşık 45 proteinden ibarettir.

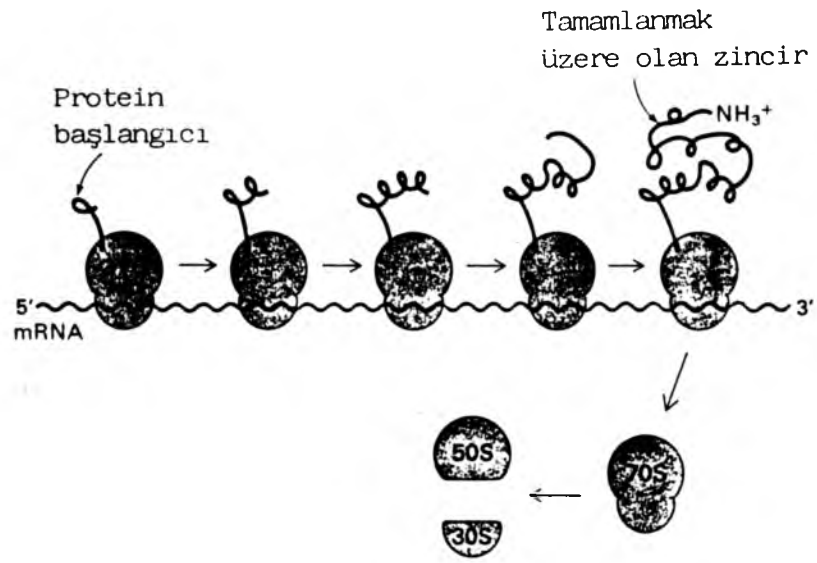
Mitokondri ve kloroplast ribozomları, ökaryotların sitoplazmalarında yer alanlardan farklı olup, daha ziyade 70S'lik ribozomlara benzemektedir. Gerçekten, mitokondri ve kloroplastlardaki protein sentezi ile bakteriyal protein sentezi arasında büyük benzerlikler vardır.

17.4.d. Protein Sentezi Safhaları

Protein sentezinin amino ⟶ karboksil yönünde gerçekleştiğini daha önceden belirtmiştik. mRNA ise, 5'⟶3' yönünde tercüme edilir. Transkripsiyonun da 5'⟶3' yönünde gerçekleştiğini hatırlarsak, mRNA henüz sentezlenirken de translasyona uğrayabileceği düşünülebilir. Gerçekten E. coli'de yapılan araştırmalar translasyonun transkripsiyonla hemen hemen beraber yürüdüğünü göstermiştir.

Bir mRNA molekülünün translasyonunda birçok ribozom aynı anda görev alabilir. Bir mRNA molekülüne bağlı bulu-

nan ribozomlar grubuna poliribozom veya polizom adı verilir. Polizomdaki her ribozom, birbirinden bağımsız olarak çalışır ve bir polipeptid zincirini sentezler. mRNA üzerinde yaklaşık seksen nükleotid başına bir ribozom bulunur. Meselâ hemoglobini (zincir başına 145 amino asit veya mRNA'sında 500 nükleotid bulunur) sentezleyen polizomda beş ribozom bulunur. mRNA'nın 5' ucuna en yakın ribozom en kısa polipeptid zincirine sahip iken, 3' ucuna en yakın ribozomda da hemen hemen sentezi tamamlanmış peptid zinciri bulunur(Şekil 17.5).



Şekil 17.5. Bir polizom şeması. Ribozomlar mRNA boyunca 5'⟶3' yönünde hareket ederler ve birbirinden bağımsız olarak fonksiyon görürler.

Daha önceden protein sentezinin amino asitlerin aktifleştirilmesinden sonra üç safhada gerçekleştiğini belirtmiştik: başlangıç, uzama ve sonlanma. Şimdi bunları ayrıntılı olarak inceleyelim:

a) Başlangıç: Yapılan araştırmalar translasyonun mRNA'nın hemen 5' ucundan başlamadığını göstermiştir. Gerçekten ilk okunan kodon 5' ucundan 25 nükleotid beride yer almaktadır. Bundan başka birçok prokaryotik mRNA'lar

polisistroniktir, yani iki veya daha fazla sayıda polipeptid zincirini şifrelerler. Meselâ E.colide triptofan sentezini gerçekleştiren beş ayrı enzim yaklaşık 7000 nükleotid uzunluğunda tek bir mRNA molekülünce şifrelenir. Bu beş proteinin herbiri için mRNA üzerinde ayrı ayrı başlama ve durma sinyalleri vardır.

Bakterilerdeki protein sentezi formil metiyonin (fMet) ile başlar. Bu iş için fMet'i ribozomlara getiren özel bir tRNA vardır. Bu başlatıcı tRNA ($tRNA_f$) içerideki pozisyonlara metiyonin getiren transfer RNA'dan ($tRNA_M$) farklıdır. $tRNA_f$'ye yapışan metiyonin, daha sonra formillendiği halde, $tRNA_M$'ye bağlananı ise, değişmeden kalır. Metiyonin bu iki çeşit tRNA'ya da aynı aminoaçil-tRNA sentetaz tarafından takılır. $tRNA_f$'ye bağlı olan metiyoninin amino grubu, bir transformilaz enzimi katalizörlüğünde aktifleşmiş formil vericisi olarak N^{10}-formiltetrahidrofolat aracılığı ile formillenir.

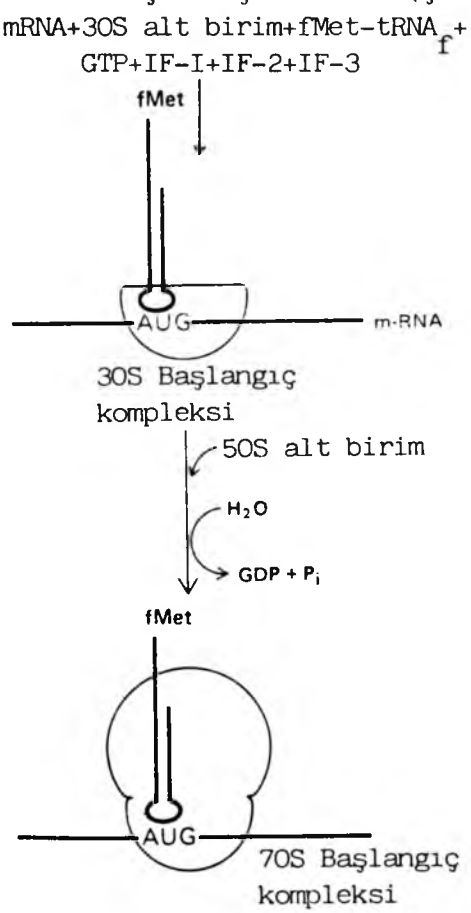
Yetmiş kadar mRNA'nın başlatıcı bölgeleri ile ribozomların oluşturdukları komplekslerin, enzimatik parçalama metodu ile incelenmesi sonucunda, 30S ribozom alt birimindeki 16S'lik rRNA'nın 3' ucunda, mRNA'nın başlatıcı kısmındaki pürince zengin bölge ile komplamenter bir baz dizilişi olduğu ortaya çıkarılmıştır. Bu komplamenterliğin mevcudiyeti ile mRNA ve ribozomların 30S alt birimi arasında bir etkileşme söz konusudur.

Bu bilgilerin ışığı altında protein sentezinin nerede başlayacağının iki çeşit etkileşme ile tayin edildiğini söyleyebiliriz: (1) mRNA'daki başlatıcı bölge ile 16S rRNA'nın 3' ucu arasındaki baz eşleşmeleri; (2) Formilmetiyonil-$tRNA_f$'nin mRNA üzerinde AUG (veya GUG) kodonlarına bağlanması.

Protein sentezi, mRNA, 30S ribozomal alt birim ve formil $tRNA_f$ birleşip, bir 30S başlangıç kompleksi oluşturmalarıyla başlar. Bu kompleksin meydana gelmesi için GTP ve IF-1, IF-2 ve IF-3 şeklinde gösterilen üç çeşit protein faktörü gereklidir. Bu başlangıç faktörlerinden

(initiation factor) IF-3, mRNA'nın bir 30S alt birimine bağlanmasında aracılık yaparken, aynı zamande 50S ve 30S alt birimlerinin birleşerek mRNA bağlayamayan 70S kompleksi haline gelmesine engel olur. IF-1 ve IF-2 de başlatıcı tRNA'nın, mRNA-30S kompleksine bağlanmasını temin eder.

Daha sonra 30S başlangıç kompleksi, 50S ribozomal alt birim ile birleşerek 70S başlangıç kompleksini oluşturur. Bağlanmış bulunan GTP bu basamakta hidroliz olur. Şimdi kompleks, protein sentezinin uzama safhası için hazırdır. Ribozom üzerindeki P bölgesi fMet-$tRNA_f$ molekülü tarafından işgal edilmiş, A bölgesi ise, gelecek olan aminoaçil-tRNA için boş durmaktır(Şekil 17.6).

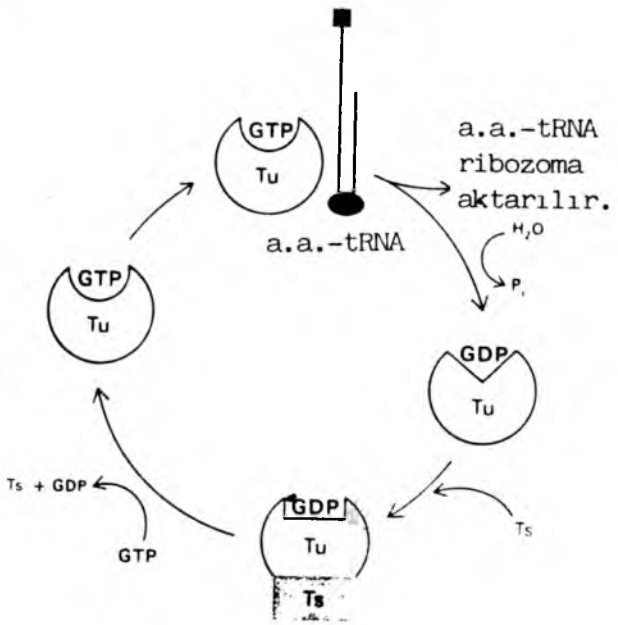


Şekil 17.6. Protein sentezinde başlangıç safhası.

b) Uzama: Protein sentezinde, bir amino asidin peptid zincirine eklenmesinden ibaret olan bir uzama siklüsü üç basamaktan ibarettir:

1. Aminoaçil-tRNA'nın bağlanması (kodon teşhisi),
2. Peptid bağı teşekkülü,
3. Translokasyon.

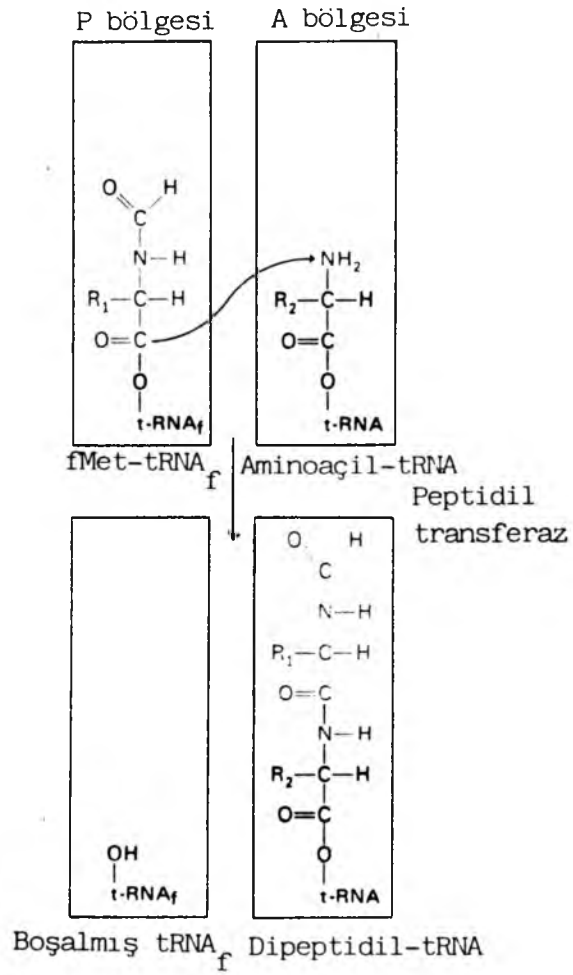
Siklüs, bir aminoaçil-tRNA'nın ribozom üzerindeki boş A bölgesine girmesiyle başlar. Giren aminoaçil-tRNA'nın cinsi A bölgesinde pozisyona getirilmiş olan mRNA kodonu tarafından belirlenir. Komplamenter aminoaçil-tRNA, A bölgesine uzama faktörü olarak adlandırılan EF-T_u (elongation factor) proteini tarafından getirilir. Aminoaçil-tRNA'nın ribozom üzerinde tam olarak pozisyonlandırılması esnasında EF-T_u'ya bağlı bulunan GTP hidrolizlenir. Oluşan GDP, EF-T_u bir diğer uzama faktörü EF-T_s ile yer değiştirinceye kadar EF-T_u faktörüne sıkıca bağlanır. Daha sonra, GTP bağlanıp T_u-GTP kompleksi teşekkül etmesiyle T_u-T_s kompleksi parçalanır. T_u-GTP bir diğer uzama devrinde görev alır (Şekil 17.7).



Şekil 17.7. Uzama faktörü T_u'nun reaksiyon devri.

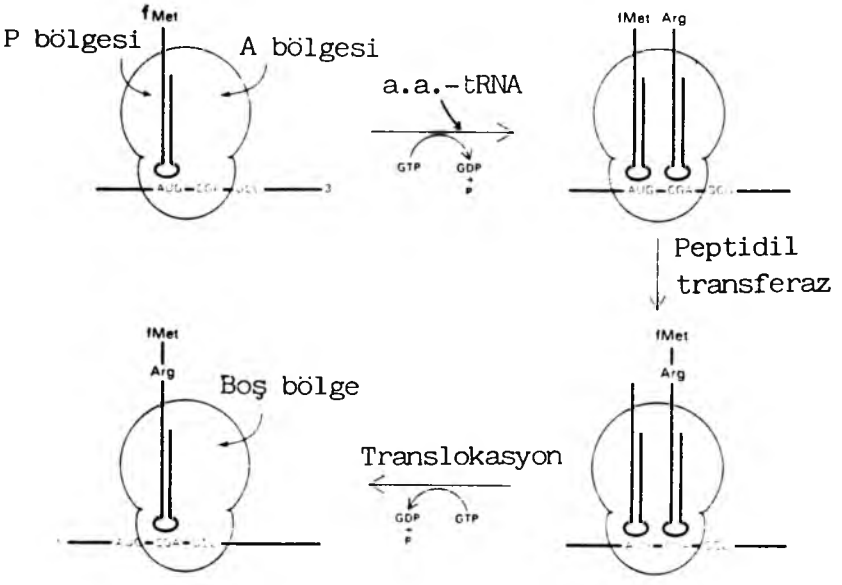
Burada kaydedilmesi gereken önemli bir nokta da EF-T_u'nun $fMet\text{-}tRNA_f$ ile etkileşmemesidir. Böylece de başlatıcı tRNA, A bölgesine yerleştirilmez; $met\text{-}tRNA_M$ ise, aynen diğer aminoaçil-tRNA'lar gibi EF-T_u'ya bağlanır.

Siklüsün ikinci basamağında peptid bağı teşekkül eder. Bu reaksiyon, 50S alt biriminin bir integral kısmını teşkil eden peptidil transferaz enzimi tarafından katalizlenir. P bölgesinde bulunan $fMet\text{-}tRNA_f$'deki aktifleşmiş formilmetiyonil birimi, A bölgesindeki aminoaçil-tRNA'nın amino grubuna aktarılarak dipeptidil-tRNA teşekkül eder (Şekil 17.8).



Şekil 17.8. Peptid bağının oluşumu.

Peptid bağının teşekkülü sonrası P bölgesinde boşalmış $tRNA_f$, A bölgesinde de dipeptidil-tRNA yer almış durumdadır. Uzama siklüsünün bundan sonraki basamağı translokasyondur. Üç çeşit taşınma söz konusudur: (1) Boş olan tRNA, P bölgesinden ayrılır, (2) Peptidil-tRNA, A bölgesinden P bölgesine taşınır ve (3) mRNA üç nükleotid mesafesi kadar hareket eder. Bu taşınmaların sonucunda gelecek aminoaçil-tRNA için müteakip kodon pozisyona getirilmiş olur. Translokasyon için üçüncü bir uzama faktörü olan EF-G'ye (translokaz adı da verilir) ihtiyaç vardır. EF-G'ye bağlı bulunan GTP, translokasyon esnasında hidrolizlenir. GTP'nin hidrolizi, EF-G'nin ribozomdan salıverilmesini ve bunun sonucu olarak da bu enzimin katalitik fonksiyonunun yerine getirebilmesini temin eder. Burada yüksek enerjili fosfat bağının sağladığı güçle belli bir yöndeki hareketin nasıl gerçekleştiğini görüyoruz. Translokasyondan sonra, bir diğer uzama devrinin başlaması için A bölgesi, bir aminoaçil-tRNA'yı bağlayacak şekilde boştur (Şekil 17.9).



Şekil 17.9. Protein sentezinde uzama safhası; aminoaçil-tRNA'nın bağlanması,peptid bağı oluşumu ve translokasyon.

c) Sonlanma: Eğer ribozomun A bölgesindeki kodon, UAA, UGA veya UAG ise, aminoaçil-tRNA bağlanmaz. Bu durma sinyalleri protein yapısındaki salıverme faktörleri tarafından tanınır. Bu faktörlerden birisi olan RF 1, (releasing factor) UAA veya UAG kodonlarını teşhis edebilirken, diğeri RF 2'de UAA veya UGA'yı tanıyabilir. Salıverme faktörünün A bölgesindeki sonlanma kodonuna bağlanması peptidil transferazı, P bölgesinde yer almakta olan polipeptid ile tRNA arasındaki ester bağını hidrolizleyecek şekilde aktifleştirir. Peptidil transferaz enziminin spesifikliği salıverme faktörü tarafından öyle değiştirilir ki, aktifleşmiş peptidil kısmının alıcısı bir amino grubundan bir H_2O molekülüne dönüşür. Daha sonra polipeptid zinciri ribozomu terkeder ve 70S ribozom da bir başka proteinin sentezini başlatmak üzere 50S ve 30S alt birimlerine ayrışır.

Ökaryotlardaki protein sentezinin başlangıç, uzama ve sonlanma safhaları prokaryotlarla hemen hemen aynıdır. Bununla beraber bazı reaksiyon mekanizmaları ayrıntıda farklılık gösterir. Meselâ ökaryotlarda başlangıçta özel bir tRNA kullanılır. $tRNA_i^{Met}$ olarak adlandırılan bu nükleik asit, formillenmemiş metiyonin bağlar.

17.4.e. Proteinlerin Sentez Sonrası Modifikasyonu

mRNA'nın translasyonu sonucu teşekkül eden polipeptid zincirlerinin çoğu, protein olarak fonksiyon görecek konformasyon ve yapıda değildir. Bu yüzden proteinler sentezlendikten sonra aşağıda izah edilen yollarla modifiye edilirler:

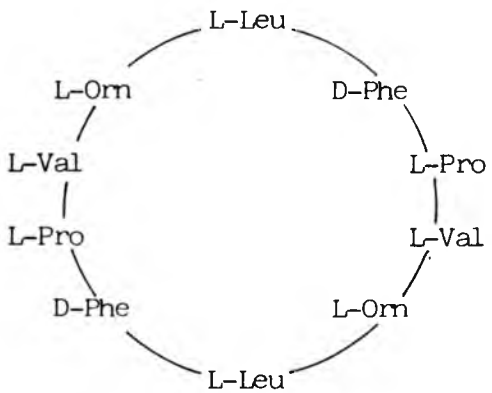
1. Bakteri proteinlerinin amino ucundaki formil grubu bir deformilaz tarafından hidrolizlenir. Amino ucundaki bir veya daha fazla rezidü, amino peptidazlar tarafından uzaklaştırılır. Hem prokaryotlarda hem de ökaryotlarda, polipeptid zincirinin geri kalan kısmı henüz sentezlenirken, uçtaki metiyonin bazen çoktan hidrolizlenmiş olur.

2. İki sistein rezidüsünün oksidasyonu ile disülfit bağları teşekkül eder.

3. Bazı amino asit yan zincirleri spesifik olarak modifiye edilir. Meselâ, kollagendeki bazı prolin ve lisin rezidüleri hidroksillenir. Asparagin, serin ve treonin yan zincirlerine şeker birimlerinin takılmasıyla glikoproteinler teşekkül eder. Bazı proteinler de fosforillenir. Bazı enzimlere de lipoat gibi prostetik gruplar kovalent olarak bağlanır.

4. Polipeptid zincirleri, prokollagenin kollagene ve proinsulinin insuline çevrilmesinde olduğu gibi spesifik olarak parçalanabilirler.

Bazı kısa polipeptidler ribozomlar tarafından sentezlenmezler. 15 amino aside kadar uzunluktaki bazı peptid zincirleri farklı bir mekanizma ile oluşturulurlar. Meselâ iki özdeş pentapeptid zincirin çember şeklinde kapanmasıyla teşekkül eden gramicidin S antibiyotiği bu şekilde sentezlenir. Bu antibiyotik spor teşkil eden bakterilerden Bacillus brevis tarafından üretilir.



Gramicidin S

Bu sistemde amino asitler, enzime bağlı tiyoesterlerin teşekkülü ile aktifleştirilirler. Amino asit dizilişleri ise, bu sistemde rol alan enzimlerin üç boyutlu yapıları ve spesifikliği ile belirlenir. Bu biyosentez sistemi yağ asitlerinin sentezine çok benzemektedir.

17.4.f. Protein Sentezini İnhibe Eden Antibiyotikler

Daha önceden belirttiğimiz gibi, inhibitörler biyokimyada çok yararlanılan araçlardandır. Çok spesifik etkilerinden dolayı biyokimyasal reaksiyon mekanizmalarının aydınlatılmasında kullanılmaktadır. Protein sentezi üzerinde etkiye sahip olan antibiyotikler de bu biyokimyasal olayın farklı basamaklarında inhibisyona sebep olduklarından, transkripsiyon ve translasyon reaksiyon mekanizmalarının aydınlatılmasında çok faydalı olmuştur. Ayrıca prokaryotik ve ökaryotik protein sentezi üzerinde antibiyotiklerin etkilerinin farklı olması bunların sıhhi amaçla da ilaç olarak kullanılmasına yol açmıştır. Şimdi protein sentezi üzerinde etkili olan antibiyotikleri ve etki tarzlarını Tablo 17.3'te özetleyelim.

Tablo 17.3. Protein sentezi antibiyotikleri.

Antibiyotik	Etkisi
Rifamisin (sentetik rifampisin)	RNA polimerazın alt birimini etkileyerek RNA sentezinin başlamasını önler (ökaryot ve prokaryotlarda).
Aktinomisin D	DNA çift sarmalına bağlanarak RNA sentezi için kalıp olmasını engeller(ökaryot ve prokaryotlarda).
Streptomisin	RNA sentezinin başlamasını önler, mRNA'nın yanlış okunmasına yol açar (prokaryotlarda).
Tetrasiklin	30S alt birimine bağlanır ve aminoaçil-tRNA'ların bağlanmasını engeller (prokaryotlarda).
Kloramfenikol	50S alt birimindeki peptidil transferaz aktivitesini inhibe eder (prokaryotlarda).
Siklohekzimid	60S alt birimindeki peptidil transferaz aktivitesini inhibe eder (ökaryotlarda).
Eritromisin	50S alt birimine bağlanarak translokasyonu engeller (prokaryotlarda).
Puromisin	Aminoaçil-tRNA analoğu olarak etkili olduğundan olgunlaşmamış zincir sonlanmasına sebep olur (ökaryot ve prokaryotlarda).

17.4.g. Protein Sentezinin Kontrolü

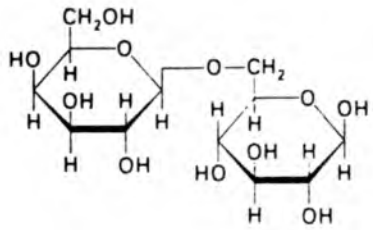
Daha önce birçok proteinin aktivitesinin zimojen aktivasyonu, kovalent modifikasyon veya allosterik etkileşmeler gibi mekanizmalarla düzenlendiğini görmüştük. Bu kısımda da metabolik olayların denetiminde kritik bir role sahip olan protein sentezi hızının kontrol mekanizmasını inceleyeceğiz.

Bakterilerde gen aktivitesi translasyondan ziyade transkripsiyon seviyesinde kontrol edilmektedir. Ökaryotik gen ifadesinin denetimi ise, daha farklı yollarla gerçekleştirilmektedir. Burada E.coli bakterisinin laktoz kullanımını hızlandıran enzim sisteminin sentezlenmesi hızının denetim mekanizmasını örnek olarak inceleyeceğiz. Francois Jacop ve Jacques Monod, aydınlattıkları bu mekanizmadan hareket ederek, protein sentezinin düzenlenmesini açıklayan bir operon modeli geliştirdiler.

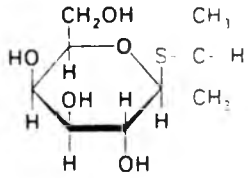
E.coli, karbon kaynağı olarak yalnız laktozu kullanabilir. Bu şekerin metabolizmasında rol alan en önemli enzim, laktozu galaktoz ve glukoza hidrolizleyen β-galaktozidaz'dır. Laktozlu bir ortamda yaşayan bir E.coli hücresi bu enzimden binlerce molekül ihtiva eder. Karbon kaynağı olarak gliserol veya glukoz gibi başka bileşikleri kullanan bakterilerde β-galaktozidaz moleküllerinin sayısı çok daha azdır. Laktoz, yeni enzim moleküllerinin sentezini indükler. Yani β-galaktozidaz indüklenebilir bir enzimdir. Bu enzim ile birlikte, aynı gen tarafından galaktosit permeaz ve tiyogalaktosit transasetilaz enzimleri de sentezlenir. Permeaz, laktozun bakteri hücresi membranından geçişi için lazım olan bir enzim olup, transasetilaz laktoz metabolizması için gerekli değildir. Transasetilazın fizyolojik rolü henüz bilinmemektedir. İn vitro olarak asetil CoA'dan tiyogalaktosidin C-6 hidroksiline asetil grubu transferini katalizlemektedir.

E.coli'de bu enzimlerin fizyolojik indükleyicisi o-

larak laktozun transglikozilasyonu ile oluşan allolaktoz görev yapmaktadır. Bu bileşiğin teşekkülü indüksiyon öncesi hücrede mevcut olan az miktardaki β-galaktozidaz molekülleri tarafından katalizlenmektedir. Yapılan çalışmalar izopropiltiyogalaktosid (IPTG) gibi metabolize olmayan bazı bileşiklerin de indükleyici olduğunu göstermiştir.

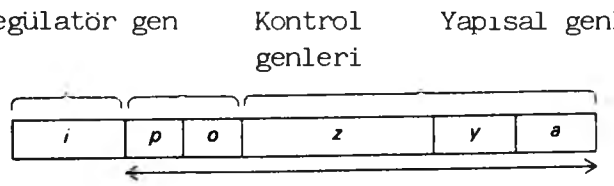


1,6-Allolaktoz



IPTG

Sözkonusu olan laktoz operonunun genetik elementlerini bir regülatör (düzenleyici) gen, bir operatör gen ve bir seri yapısal genler oluşturmaktadır.

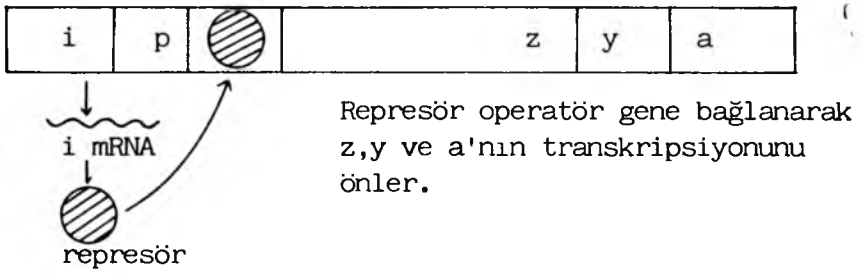


Laktoz operonu

Regülatör gen, operatör genle etkileşebilen ve protein yapısında molekül olan bir represör meydana getirir. Operatör gen kontrol ettiği yapısal genlerin bitişiğinde bulunur. Represör proteinin operatör gene bağlanması sonucu yapısal genlerin transkripsiyonu engellenir. Operatör gen ve beraberindeki yapısal genlere birarada operon adı verilir. Laktoz operonunda "i" geni regülatör geni, "o" geni, operatör geni, "z,y ve a" genleri de yapısal genleri temsil etmektedir. Ayrıca RNA polimerazın bağlanması için "p" ile gösterilen bir promoter bölgesi vardır. IPGT gibi indükleyici bileşikler represöre bağlanarak

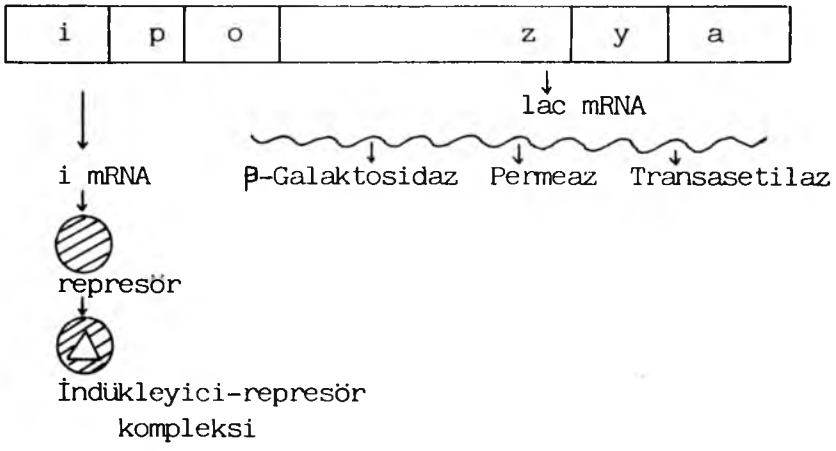
onun operatör genle etkileşmesini önler. Bu durumda da z,y ve a genleri sözü edilen üç enzimi şifreleyen bir mRNA molekülüne çevrilir. Aşağıda laktoz operonunun indüklenme ve baskılanma (repression) mekanizmalarını şema ile göstereceğiz.

Baskılama



Represör operatör gene bağlanarak z,y ve a'nın transkripsiyonunu önler.

İndükleme



Burada laktoz operonu modeli ile anlatmaya çalıştığımız protein sentezinin kontrolü, daha birçok başka faktörler tarafından da etkilenmektedir. Aslında bu konunun ayrıntılarıyla incelendiği bilim dalı moleküler biyolojidir. Biyokimya dersi boyutları içinde bu konuya bu kadar değinmekle yetineceğiz.

18. BÖLÜM: H O R M O N L A R

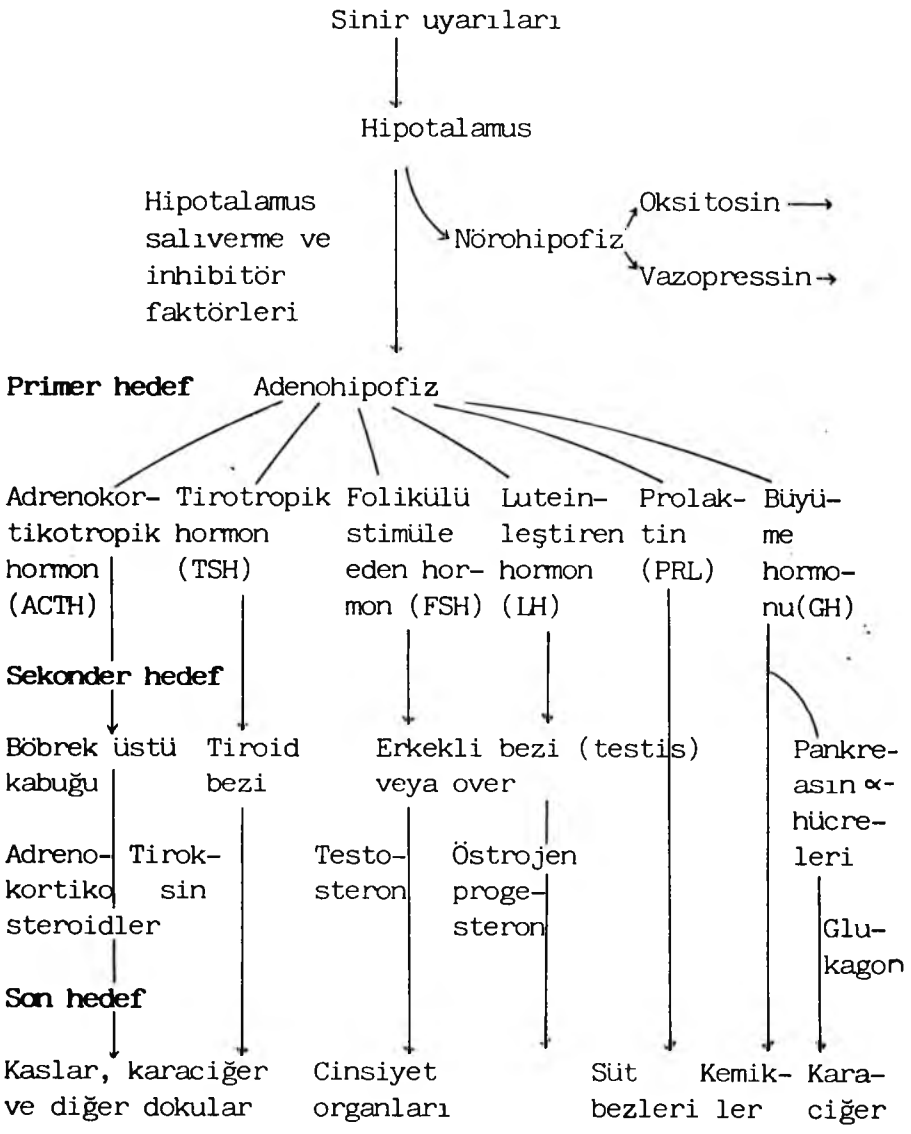
Hormonlar, değişik iç salgı (endokrin) bezlerinde küçük miktarda sentezlenen ve kan yoluyla hedef organlara taşınılan kimyasal habercilerdir; omurgalıların hedef organlarında bir seri fizyolojik ve metabolik aktiviteleri düzenlerler. Endokrinoloji, uzun zamandan beri omurgalıların fizyolojisinin önemli bir alanı olmasına rağmen, birkaç hormonun moleküler yapısı hakkında yapılan biyokimyasal araştırmalar hariç, son 60 yıla kadar hormon etkisinin biyokimyasal mekanizması hakkında hemen hemen hiçbir şey bilinmiyordu. Son yıllarda hormonların fonksiyonlarının moleküler analizinde önemli mesafeler alındı.

Bu bölümde hormonların salgılanması ve fonksiyonlarının fizyolojik ve anatomik sonuçları anlatılmayacaktır. Daha çok omurgalılarda merkezi metabolizma yolların düzenlenmesine katılan ve biyokimyasal fonksiyonu yavaş yavaş anlaşılan bazı hormonlar detaylı olarak tanıtılacaktır.

18.1. MEMELİLERDE ENDOKRİN SİSTEMİN ORGANİZASYONU

Şekil 18.1'de memelilerin endokrin sisteminin organizasyonu gösterilmiştir. Hormonların bazılarının sentezi ve salgılanması, hiyerarşik tarzda hormon-hedef hücre etkileşmesinin birbirini takip eden basamakları üzerinden kontrol edilir. Hipotalamus, beyin üzerindeki spesifik bir sinirsel haberciyle karşılaşırsa, salgılatma faktörleri denilen küçük miktarda hormonlar salgılar; bu hormonlar pfortader sistem üzerinden adenohipofize varırlar. Adenohipofizde salgılatma faktörlerinin herbiri spesifik bir hormonun salgılanmasını uyarabilirler. Meselâ, tirotropik hormonu salgılatan faktör (TRF) tirotropin (tirotropik hormon)'in ve kortikotropik hormonu salgılatan faktör (CRF) kortikotropin (adrenokortikotropik hormon, ACTH)'in salgılanmasını uyarır. Hipotalamus, inhibitör faktörleri adı verilen ve bazı hipofiz hormonlarının sal-

gılanmasını inhibe edebilen hormona benzer maddeleri de salgılar.



Şekil 18.1. Hipotalamusun kontrolü altında endokrin düzenlenmenin hiyerarşik organizasyonu.

Adenohipofizden salgılanan değişik hormonlar (Şekil 18.1) kan dolaşımı yoluyla spesifik hedef bezlere giderler. ACTH'nin hedefi böbrek üstü kabuğu ve tirotropik hormonun hedefi ise tiroid bezidir. Bu bezler ve adenohipofizin diğer hormonlarının hedef bezleri de (özellikle gonadlar) karakteristik hormonların üretimi için uyarılır ve oluşan bu hormonlar da belirli dokulara etki ederler. Adenohipofiz üzerinde etkili olan değişik salgılatma ve inhibitör faktörlerinin salgılanması yanında hipotalamus, en azından iki değişik hormon daha oluşturur: oksitosin ve vazopressin. Antidiüretik hormonlar olarak da adlandırılan bu hormonlar laktasyon veya su dengesinin ayarlanmasında önemlidir. Bu hormonlar nörofizin adı verilen küçük proteinlere bağlı olarak nörohipofize gelirler ve oradan kan dolaşımına salgılanırlar.

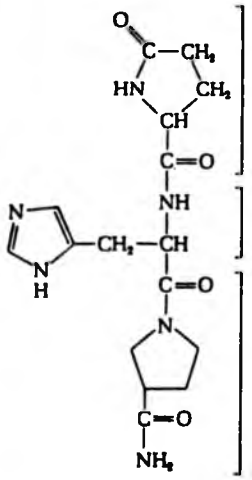
Hipofiz tarafından kontrol edilmeden direkt olarak salgılanan hormonlar da vardır. Bunlara örnek olarak, tiroid bezi ve paratiroid bezinin belirli hücrelerinde oluşturulan polipeptid yapısında olan kalsitonin ve Ca^{+2} ile fosfat düzeylerini ayarlayan parathorman verilebilir. Bu gruplara, pankreasın langerhans adacıklarının β-veya α-hücrelerinde sentez edilen polipeptid yapısında insulin ve glukagon ile böbreküstü bezinin medulla kısmının hormonları olan adrenalin ve noradrenalin girerler. Burada sayılan hormonlar yanında, fizyolojik aktiviteleri çeşitli şekilde kontrol eden çok daha farklı hormonlar bulunmuştur.

Hormonların salgılanması kompleks bir kontrol şebekesiyle ayarlanır. Sinir sistemi vasıtasıyla taşınan dış uyarılar, hipotalamusun aktivitesini değiştirir ve aynı zamanda böbreküstü bezinin medullasından adrenalinin salgılanmasını ayarlar. Adenohipofiz vasıtasıyla tropik hormonlarının salgılanması da, bir feed-back mekanizmasıyla hedef bezlerinin karakteristik salgılanması şekline göre ayarlanır. Örnek olarak, böbrek üstü kabuğundan salgılanan glukokortikoid hormonların yüksek bir kan konsantrasyonu, hipofizden ACTH'nin salgılanmasını feedback

inhibisyonuna maruz bırakır. Bazı hormonların salgılanması kanda spesifik metabolit konsantrasyonuyla ayarlanır (meselâ kanda glukoz konsantrasyonu artarsa pankreastan insulinin salgılanması uyarılır). Tiroksinin yüksek bir kan konsantrasyonu, adenohipofizde tirotropik hormonu salgılatan faktörün etkisini inhibe eder.

Hipotalamustan kısa peptidlerden ibaret bazı salgılama ve inhibitör faktörleri izole edilmiş ve yapısı aydınlatılmıştır; Şekil 18.2'de bazı örnekler gösterilmiştir. Bunlar çok az miktarda sentezlenirler. Meselâ mezbahalardan alınan tonlarca hipotalamus dokularından sadece 1 mg tirotropik hormonu salgılatan faktör (TRF) elde edilmiştir.

Adenohipofizin hormonları büyük polipeptidlerdir (Tablo 18.1). Çoğunun amino asit sıralanışı açıklanmıştır ve bazıları sentez edilmiştir. TSH ve LH aynı alt birimleri taşırlar.

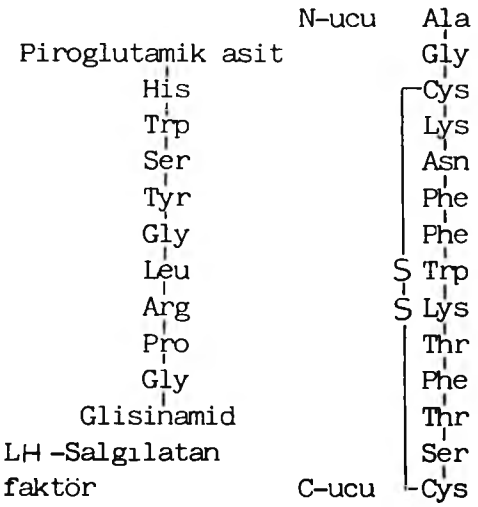


Piroglutamik asit

Histidin

Prolinamid

Tirotropik hormonu salgılatan faktör



Şekil 18.2. Büyüme hormonunun salgılanması için hipotalamustan salgılanan iki salgılatma faktörü ve bir inhibitör faktörünün yapısı.

Tablo 18.1 Polipeptid hormonlarının bazı karakteristik değerleri.

	Yaklaşık molekül ağırlığı	Yaklaşık amino asit sayısı	Diğer komponentler
Adenohipofiz			
Tirotropik hormon	28.300	220	Oligosakkarit
Adrenokortikotropik hormon	4.700	39	--
Luteinleştiren hormon	28.500	200	Oligosakkarit
Folikülü stimüle eden hormon	34.000	200	Oligosakkarit
Prolaktin	21.500	191	--
Büyüme hormonu	21.000	191	--
Nörohipofiz			
Oksitosin	1.070	9	--
Vazopressin	1.070	9	
Böbrek üstü kabuğu ve tiroid bezi			
Parathormon	9.500	84	--
Kalsitonin	4.500	32	--
Pankreas			
İnsulin	5.500	51	--
Glukagon	3.500	29	--

18.2. HORMON RESEPTÖRLERİ VE İNTRASELÜLER (HÜCRE İÇİ) HABERCİ MADDELER

Hormon etkisinin iki temel prensibi, son yıllarda yapılan araştırmalarla açıklığa kavuşturulmuştur. Birincisi; hedef hücreler hormon molekülünü yüksek spesifite ve afinite ile bağlayabilen özelleşmiş proteinler olan spesifik hormon reseptörlerine sahiptirler. Bu gibi hormon reseptörleri hedef hücrelerde çok küçük miktarda mevcutturlar. Adrenalin, glukagon ve insulin gibi hücre membranlarını kolay geçemeyen suda çözünen hormonların hedef hücrelerinde hormon reseptörleri, hücre yüzeyinde

lokalize olmuşlardır. Lipidler içinde çözünebilen steroidler sınıfından hücre membranını kolayca geçebilen cinsiyet hormonları ve böbrek üstü kabuğu hormonlarının hedef hücrelerinde, hücre içinde sitozolde primer reseptörleri bulunurlar.

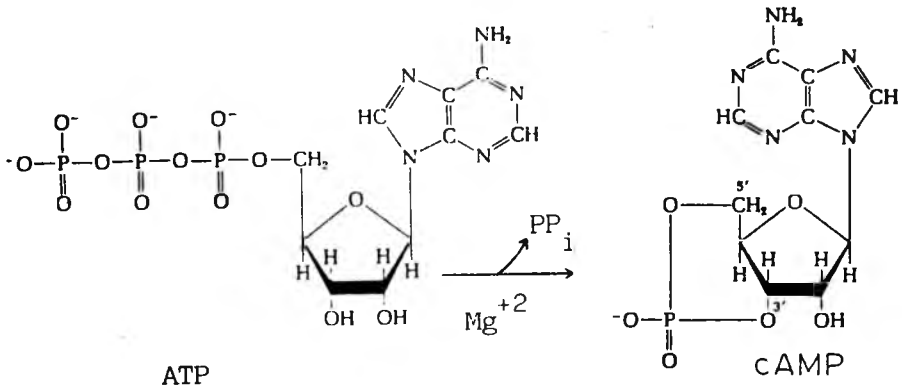
İkinci prensip ise, hormonun spesifik reseptörüne bağlanması hücre içi bir haberci molekülün oluşumuna sebep olur; daha sonra bu haberci molekül hedef dokunun belirli karakteristik biyokimyasal aktivitesini uyarır veya inhibe eder. Polar ve suda çözünen hormonlar olan adrenalin ve glukagan için hücre içi haberci sekonder elçi diye de adlandırılan 3',5'-siklik adenilik asit (siklik AMP)'dir. Yağda çözünen steroidlerde, hormon-reseptör kompleksinin bizzat kendisi hücre içi haberci rolünü oynar.

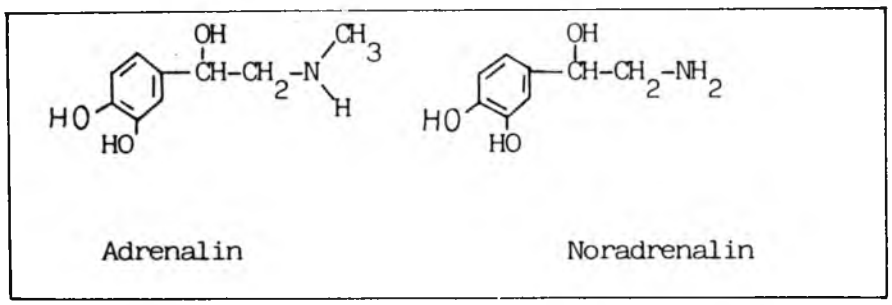
Şimdi merkezi metabolizma yolları üzerinde önemli düzenleyici etkileri olan hormonların yapısı, biyosentezi, salgılanması ve etki tarzları anlatılacaktır. Bunun için böbreküstü bezi iliğinden (medullasından) salgılanan adrenalin (epinefrin) ile başlanacaktır; zira onun karaciğer üzerindeki etkisi, hormon etkisinin moleküler esaslarını anlamamızda ilk önemli basamak olmuştur.

18.3. ADRENALİN VE cAMP

Adrenalin (Şekil 18.3)'in kana salgılanması bir seri reaksiyona sebep olur. Bu reaksiyonlara, kan basıncının artması, kalp çarpıntısı ve kalp fonksiyonunun artması ve düz kaslar üzerinde bazısında gevşemeye, bazısında kasılmaya götüren karakteristik etkiler girerler. En önemli biyokimyasal sonuç, glikojenin kaslarda laktata ve karaciğerde kan glukozuna çok daha büyük ölçüde yıkımıdır.

Earl Sutherland ve arkadaşları adrenalinin plazma membranında Mg^{+2}'ye bağımlı bir enzimatik reaksiyonu çok kuvvetle uyardığını tesbit ettiler. Bu reaksiyonda ATP, inorganik pirofosfatın açığa çıkmasıyla siklik AMP(cAMP)'ye dönüşür:



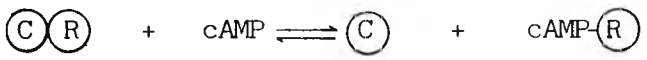


Şekil 18.3. Böbrek üstü iliğinde sentezlenen hormonlar: Noradrenalin sinir sisteminde nörotransmitter olarak etki yapar.

Bu reaksiyonu kataliz eden adenilat siklaz enzimi birçok hayvansal dokularda mevcuttur. Enzim, plazma membranına çok sıkı bağlanmıştır. Adenilat siklaz substrat olarak ATP için spesifiktir; ADP veya diğer nükleotid trifosfatlardan siklik nükleotid oluşturmaz.

cAMP'yi fosforilaz sistemine bağlayan anahtar enzim bir allosterik enzim olan protein kinazdır. Bu enzimin inaktif şekli iki alt birim ihtiva eder; bir katalitik alt birim (C) ve katalitik birimi inhibe eden bir düzenleyici alt birim (R). cAMP, protein kinazın bir allosterik modülatörüdür. cAMP düzenleyici alt birimin spesifik

bir yerine bağlanır; daha sonra inaktif CR-kompleksi, R-cAMP ve serbest C altbirimine ayrışır. Oluşan C alt birimi katalitik olarak aktiftir:



İnaktif protein kinaz — Aktif protein kinaz

Protein kinaz, inaktif fosforilaz kinazı ATP vasıtasıyla fosforiller ve fosforillenmiş aktif fosforilaz kinaz meydana gelir;

$$\text{Defosfofosforilaz kinaz (inaktif)} + ATP \xrightarrow{\text{Aktif protein kinaz}} \text{Fosfofosforilaz kinaz (aktif)} + ADP$$

Fosforilaz kinaz molekül ağırlığı bir milyonun üzerinde olan 16 alt birimli bir proteindir; bütün alt birimler bir serin üzerinden protein kinaz vasıtasıyla fosforillenir.

Protein kinaz sadece fosforilaz kinazı değil, aynı zamanda belirli histonlar, ribozomal proteinler, yağ hücrelerinin, mitokondrilerin, mikrozomların ve lizozomların membranlarının proteinlerini de fosforiller. Bütün bu hallerde protein kinaz aktivitesi için cAMP gerekir.

Karaciğerde cAMP konsantrasyonu adrenalin bağlanmasından sonra çok hızlı bir şekilde artmasına rağmen, daha sonra adrenalinin uzaklaşması veya bozulmasıyla tekrar hızlıca düşer. cAMP'nin yıkımından sorumlu enzim aşağıdaki reaksiyonu katalizleyen fosfodiesteraz enzimidir.

$$cAMP + H_2O \longrightarrow \text{Adenozin 5'-Fosfat}$$

Mg^{+2}'a bağımlı fosfodiesteraz çoğu hayvansal dokuların sitozolünde mevcuttur. Kahvede veya çayda küçük miktarda

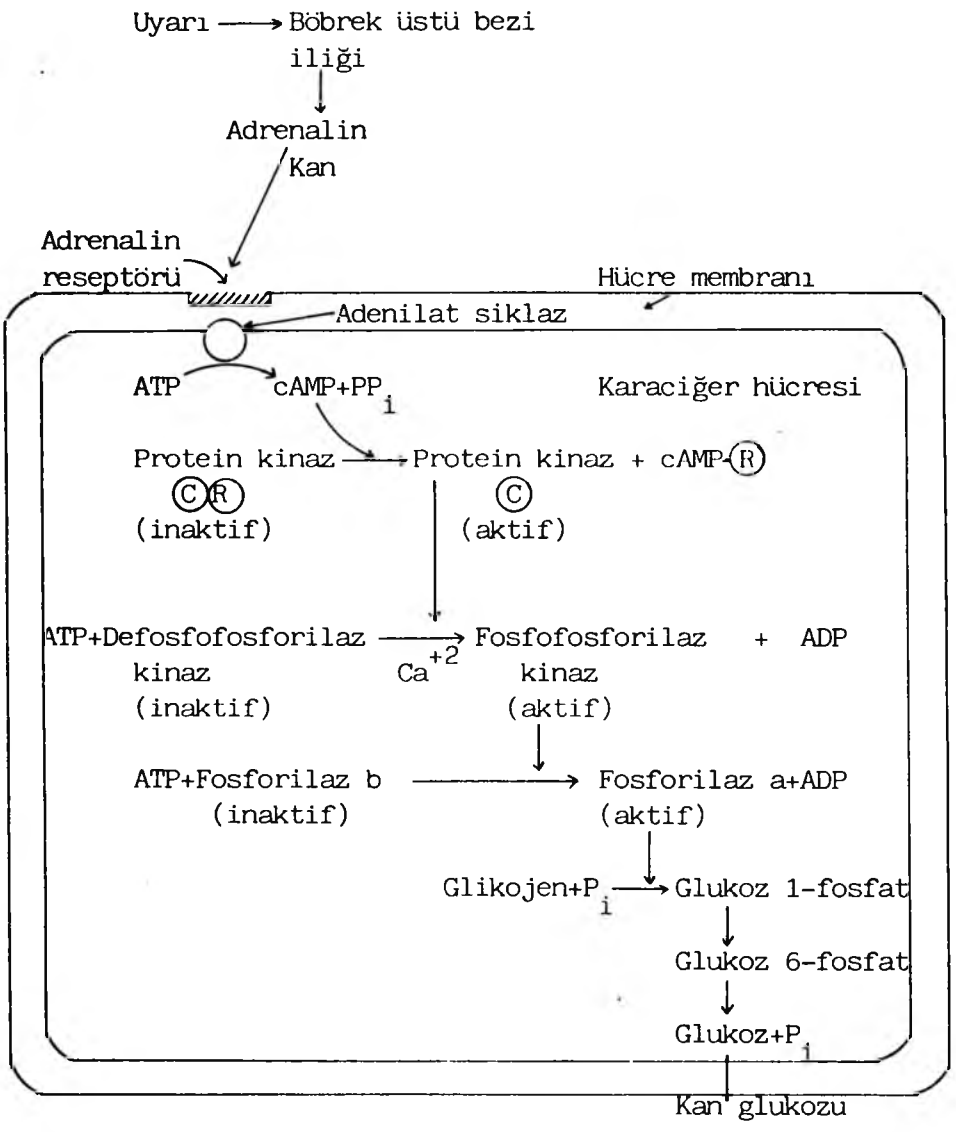
bulunan alkaloidlerden kafein ve teofilin ile inhibe edilir. Bazı dokularda fosfodiesteraz aktivitesi Ca^{+2} ile modifiye edilir.

Fosforilaz kinaz, ATP kullanarak inaktif fosforilaz b'nin aktif fosforilaz a'ya fosforillenmesini katalizler. Bu sırada aktivite için Ca^{+2} gereklidir. Oluşan fosforilaz a da glikojeni glukoz 1-fosfata yıkar. Son olarak glukoz 1-fosfattan glukoz 6-fosfat ve serbest kan glukozu meydana gelir. Adrenalinin karaciğerde glikojen yıkımını uyarması sonucundaki reaksiyon serisi Şekil 18.4'de özetlenmiştir.

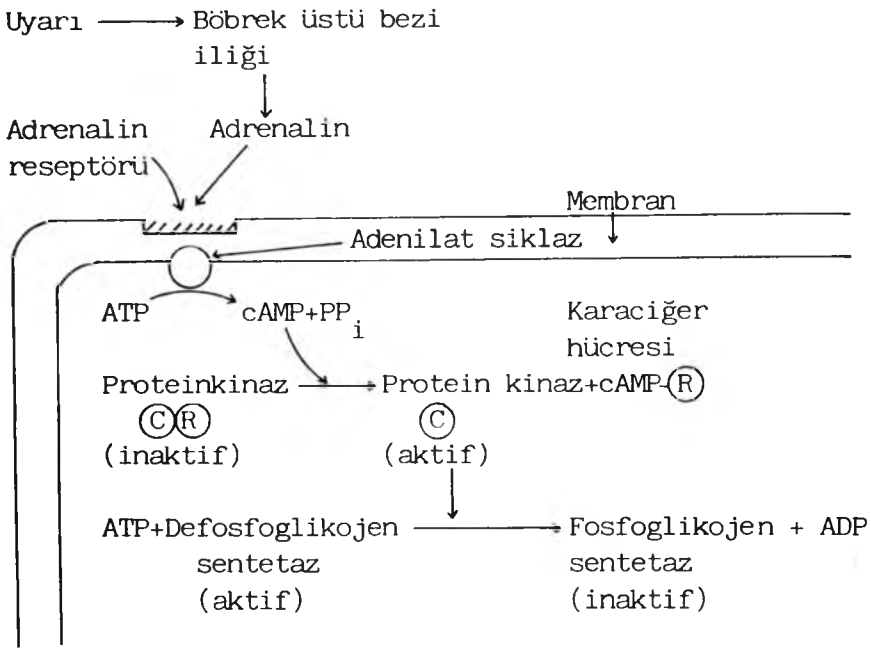
Adrenalin sadece glikojen yıkımını uyarmakla kalmaz, aynı zamanda karaciğerde glikojen sentezini de inhibe eder. Yine önce adrenalin karaciğer hücresine bağlanır ve cAMP sentezi sonucu protein kinaz aktifleştirilir. Aktif protein kinaz, glikojen sentetazın aktif formonu fosforilleyerek inaktif formuna dönüştürür. Bu sırada glikojen sentetazın 6 serin amino asidi ATP kullanılmasıyla fosforillenir(Şekil 18.5).

Adrenalin böbrek üstü bezi iliğinden kana salgılandığı sürece karaciğerin adenilat siklaz sistemi aktif kalır ve yüksek cAMP konsantrasyonu elde edilir. Adrenalin salgılanması kesilirse, karaciğerde hücre membranına bağlı adrenalin ayrışır; cAMP artık sentezlenmez ve önceden mevcut olan fosfodiesterazla hidroliz olur. Protein kinazın alt birimleri hiçbir katalitik aktivite göstermeyen kompleks haline yeniden dönüşür. Fosforilaz kinazın fosforillenmiş şekli ve fosforilaz a, fosforilaz fosfatazın etkisiyle defosforillenir.Bu şekilde glikojen yıkımı durur; aynı zamanda glikojen sentetaz defosforillenerek tekrar aktive edilir.

Adrenalin, karaciğerdeki etkisinin yanında iskelet kasında da glikojenin laktata yıkımını gerçekleştirir. Burada da glikojen fosforilaz cAMP ile uyarılır.Adrenalin yağ hücrelerinde bir lipazı da aktive eder. Bu vasıtayla



Şekil 18.4. Karaciğerde adrenalin vasıtasıyla glikojen yıkımının uyarılmasında kan glukozuna kadar giden reaksiyon serisi. Adrenalin, yaklaşık 10^{-9} M'lık bir konsantrasyonda kana salgılanır; bu durumda kan glukoz seviyesinin artışı yaklaşık 5 mM'dır, yani artış yaklaşık 3 milyon kattır.



Şekil 18.5. Adrenalin vasıtasıyla karaciğerde glikojen sentezinin inhibisyonu.

triaçilgliseroller serbest yağ asitlerine yıkılırlar. Bu etki, adenilat siklazın uyarılması ve lipazın inaktif formunu fosforilleyen aktif bir protein kinaz oluşumuna dayanır. Ayrıca adrenalinin spesifik katekolamin reseptörleri ve cAMP oluşumu üzerinden, kalp çarpıntısı ve kalp fonksiyonu üzerine karakteristik etkileri vardır. Glikojen kalpte kan glukozuna değil, laktata dönüşür. Kalp ve kasta glukoz 6-fosfataz yoktur.

18.4. GLUKAGON

Adrenalin yanında, belirli hedef hücrelerde diğer bazı hormonlarda cAMP konsantrasyonunu yükseltebilirler. Bu hormonlardan birisi de hiperglisemik-glikojenolitik hormon olarak adlandırılan glukagondur. Glukagon, pankreasın bir polipeptid hormonu olup, kan glukoz seviyesi 100 ml'de yaklaşık 80 mg olan normal değerin altına düşer düşmez langerhans adacıklarının α-hücrelerinden kana salgılanır. Serbest hale geçen glukagon karaciğerde glikojen

yıkımını uyarır ve böylece kanın glukoz seviyesini normal sınırlara yükseltir. Buna göre glukagon insuline zıt etki gösterir. Glukagon ve insulin, pankreasın farklı hücre tiplerinde sentezlenirler. Glukagon 29 amino asitten oluşan bir polipeptiddir; glukagon C-terminal ucunda ek amino asit zinciri ihtiva eden yüksek molekül ağırlıklı inaktif proglukagon halinde sentezlenir(Şekil 18.6).

Glukagon karaciğere primer olarak etki eder, kaslarda glikojen yıkımı üzerinde hiçbir etki göstermez. Halbuki adrenalin hem karaciğer hem de kaslar üzerinde etkilidir. Glukagon adrenalin gibi karaciğer hücresinin plazma membranında spesifik bağlanma bölgesine bağlanır ve adenilat siklazı uyarır. Böylece cAMP miktarında artış olur ve adrenalin için anlatılan reaksiyon serisi burada da cereyan eder.

N-terminal

His-Ser-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-
-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Glu-Asp-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Met-Asn-
-Thr-Lys-Arg-Asn-Asn-Lys-Asn-Ile-Ala

C-terminal

Şekil 18.6. Sığırdan elde edilen glukagonun amino asit sıralanışı (29 amino asit, molekül ağırılığı=4500). Proglukagon C-terminal ucunda ek amino asitleri ihtiva eder (çizgiyle ayrılmış).

18.5.cAMP'NİN ARACI OLDUĞU DİĞER ENDOKRİN VE DÜZENLEYİCİ SİSTEMLER

Hedef hücre yüzeylerinde spesifik bağlanma yerlerine bağlanarak, membrana bağlı adenilat siklazı uyaran diğer bazı hormonlar da bilinmektedir. Adenohipofiz hormonları olan ACTH,LH,FSH,TSH ile parathormon ve kalsitonin bu gruba girerler. Nörohipofiz hormonu olan vazopressin, böbreklerde cAMP miktarını artırır. Birçok hormon cAMP oluşumunu uyararak etki gösterdiği halde, her hormon özel

spesifiteye sahiptir; çünkü her hormon sadece kendi reseptörünü ihtiva eden hücrede cAMP sentezini uyarır. Bundan başka cAMP, uyarılan hücrede kalır ve kan dolaşımına gitmez ve bu suretle her hücrenin genel bir uyarılmasına sebep olabilir.

cAMP hücrelerde diğer ayarlayıcı sistemlerde de haberci rolü oynar. Enzimlerin uyarılmış sentezine aracılık eder, sinir sisteminde sinaptik iletime iştirak eder, hücre bölünmesinin düzenlenmesinde fonksiyon görür ve dokuların iltihap ve immun reaksiyonlarında da aracıdır. Koleraya sebep olan toksin (vibria cholerae), ağır bir ishale ve bağırsaktan su kaybına sebep olur, aynı zamanda bağırsak hücrelerinin spesifik reseptörlerine bağlanarak cAMP'nin artmasını uyarır. Bunun sonucu olarak bağırsak hücrelerinde aktif transport prosesi patolojik bir artış gösterir.

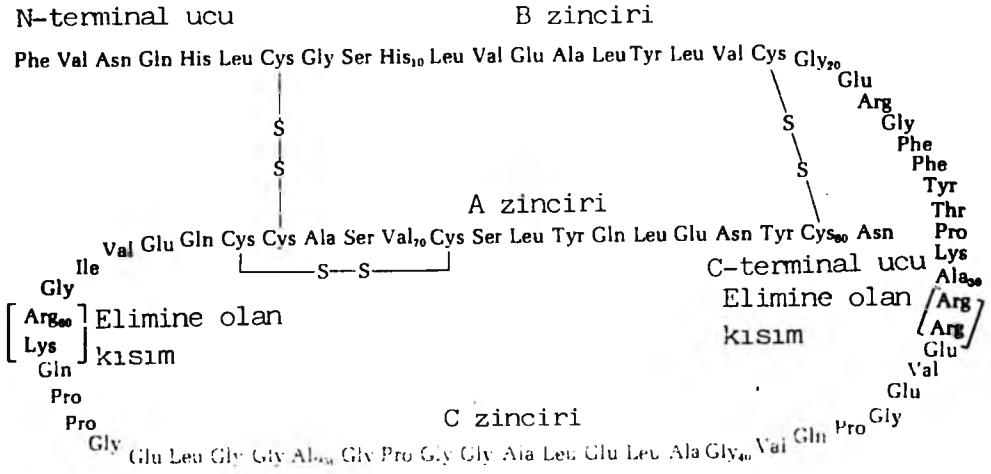
cAMP'nin etkisi farklı hücrelerde iki başka hücresel komponent vasıtasıyla büyük ölçüde etkilenir: serbest Ca^{+2} ve değişik prostaglandinler. Bazı durumlarda Ca^{+2} cAMP'nin etkisini artırır, bazı durumlarda inhibe eder. Prostaglandin E_1'in bazı hedef hücrelerde hücre yüzeyindeki hormon reseptörü ve membrana bağlı adenilat siklaz arasında başka bir haberci olarak etki yaptığı kabul edilmektedir. Diğer taraftan prostaglandin A_1, bağırsak hücrelerinin adenilaz siklazını inhibe eder, bu sırada enzimin spesifik yerine bağlanır.

18.6. İNSULİN: SENTEZİ, DEPOLANMASI VE SALGILANMASI

İnsulin, önce proinsulin halinde pankreasta sentezlenir. Proinsulin, organizma cinsine göre 81 ile 86 arasında amino asitten meydana gelen tek bir polipeptid zincirinden ibarettir(Şekil 18.7); insulinin A ve B zincirlerini ihtiva eder. A zinciri proinsulin zincirinin C-terminal ucunu ve B zinciri N-terminal ucunu oluşturur. A ve B zincirleri bir C zinciriyle birbirlerine bağlanırlar; bu sırada A ile C ve B ile C zinciri arasında ikişer bazik amino asit bulunur. Proinsulin molekülü tabii insu-

lindeki gibi A ve B zincirlerinin aynı pozisyonlarında üç disülfit köprüsüne sahiptir. Farklı türlerin proinsulinlerinde C zincirinin amino asit sıralanışı ekseriya farklılık gösterir; bu farklılık A ve B zincirlerindeki farklılık oranından çok daha büyüktür.

Proinsulin, insuline benzer aktiviteyi çok az miktarda gösterir. Proinsulinin insuline dönüşümü, ada dokusundaki peptidazlar vasıtasıyla gerçekleşir.



Şekil 18.7. Sığırdan elde edilen insulin ve proinsulinin yapıları (çizgiden yukarısı insulini göstermektedir).

İnsulin, proinsulin halinde ribozomlarda sentez edildikten sonra, endoplazmik retikulumun kanalları yoluyla golgi cisimciklerine taşınır. Golgi cisimciklerinde proinsulin, insulin ve C-peptidine parçalanır. İnsulin ve C peptidi burada Zn^{+2} ile birlikte düzenli bir şekilde kristallenerek depolanır. Son olarak bu vezikül muhtevası, kan şeker seviyesinin yükselmesinin sebep olduğu belirli bir sinyal üzerine bir ekzositoz vasıtasıyla kana salınır. Ca^{+2} insulinin serbest hale geçmesinde önemli bir rol oynar.

İnsulinin insan kan ve dokularındaki konsantrasyonu

o kadar küçüktür ki, normal kimyasal metodlar ve biyoölçümler vasıtasıyla salgılanması ve değerlendirilmesi üzerine araştırmalar yapılabilmesine imkan vermez. Bununla birlikte hassas radyoimmunassay metoduyla kanda ml başına yaklaşık 0,4 ng insulin (yaklaşık 1 nM) bulunduğu gösterilebilmiştir. Karbohidratça zengin bir yemekten sonra bu değer 3-4 kat artar. Normal insan pankreası yaklaşık 10 mg insulin ihtiva eder; günlük salgılanan miktar sadece 1-2 mg kadardır. Serbest C-peptidi ve küçük miktarda proinsulin insulinle birlikte kana verilir.

İnsulinin pankreastan salgılanması, kandaki glukoz konsantrasyonu ve belirli başka faktörlere bağlıdır. Kan glukozu 100 ml başına 80-90 mg'lık normal değerin üzerine önemli oranda çıkarsa (meselâ, yemekten sonra), plazma membranına en yakın bulunan β-hücrelerinin salgılama vezikülleri muhtevalarını kana verirler. İnsulin konsantrasyonu yemekten sonraki 1-2 saat içinde tekrar normal değerine döner. İnsulin molekülünün kanda yarılanma süresi yaklaşık 3-4 dakikadır. İnsulinin salgılanması, mide ve bağırsaklar tarafından salgılanan spesifik faktörler ve belirli amino asitlerin yüksek konsantrasyonuyla uyarılır.

İnsulinin hedef dokulara etkisi: İnsulinin bir memeli hayvana verilmesinin en göze çarpan etkisi kan şeker seviyesini hemen düşürmesidir. Bu değişmenin, glukozun kandan kas ve yağ hücrelerinin hücre membranları vasıtasıyla hücre içine taşınmasının artması sonucu meydana geldiği kabul edilmektedir. İnsulin, glikojen sentetazın inaktif formunun aktif formuna dönüşümüne direkt bir etki de yapmaktadır. Bundan başka insulin lipolizi inhibe eder.Bunların sonucu olarak, periferik dokularda artmış kan glukozu glikojen ile lipidlere dönüşür ve CO_2'ye okside olur.

İnsulin, amino asitlerden protein sentezini de kolaylaştırır. Glukokinaz ve fosfofruktokinazın indüksiyonunu artırırken, piruvat karboksilaz ve fruktoz 1,6-di-

fosfataz gibi glukoneogenezdeki belirli enzimlerin oluşumunu inhibe eder. İnsulin, hedef hücrelerinin plazma membranları üzerine genel bir etki göstererek sadece glukozun değil, amino asitlerin, lipidlerin ve K^+'nın da girişini artırır.

İnsulin, hedef hücrelerine spesifik reseptörlerle bağlanır. Normal yağ hücreleri μm^2 yüzeyi başına yaklaşık 10 insulin reseptörü ihtiva ederler. Hücre başına 100 reseptör yerinden daha az pozisyona insulinin bağlanması, ölçülebilir metabolik etkiyi gösterebilmek için yeterlidir. İnsulinin reseptör proteininin molekül ağırlığı 300.000 civarında olup, insuline afinitesi çok yüksektir. İnsulin-reseptör kompleksinin ayrışma sabiti 10^{-10} M civarındadır.

İnsulin adrenalin ve glukagondan şu farkla ayrılır; hedef hücresinin membranına bağlanak cAMP artışına sebep olmaz. İnsulin gerçekte cAMP'nin azalışına sebep olur. Bu beklenen bir durumdur, zira insulinin kan şeker üzerine etkisi glukagonun tersidir. Cuatrecasas ve diğer araştırmacılar insulinin yağ hücrelerinin membranındaki reseptörlere bağlandığında cGMP'nin konsantrasyonunun arttığını ve cAMP'nin aynı zamanda azaldığını ortaya çıkardılar. Bu her iki düzenleyici nükleotidler olan cAMP ve cGMP konsantrasyonları hücresel olaylarda birbirine zıt tarzda değişir. Bu gözlemler, cAMP ve cGMP'nin birbirine zıt tarzda fonksiyon gördüğü kabulüne götürdü(yin-yang hipotezi).

İnsulinin etki tarzı glukagon, büyüme hormonu, glukokorikoid hormonları ve adrenalinin etkilerine zıttır. Büyüme hormonu, birçok dokulda cAMP seviyesini Ca^{+2}'ye bağlı olarak artırma etkisi gösterir, karakteristik olarak glukagonun α-hücrelerinden salgılanmasını da uyarır. Bir böbreküstü kabuğu glukokortikoidi olan kortizol (Şekil 18.8) hem karaciğerden glukozun salınmasını hem de şimdiye kadar bilinmeyen mekanizmalarla glikojenin depolanmasını artırıcı etki gösterir.

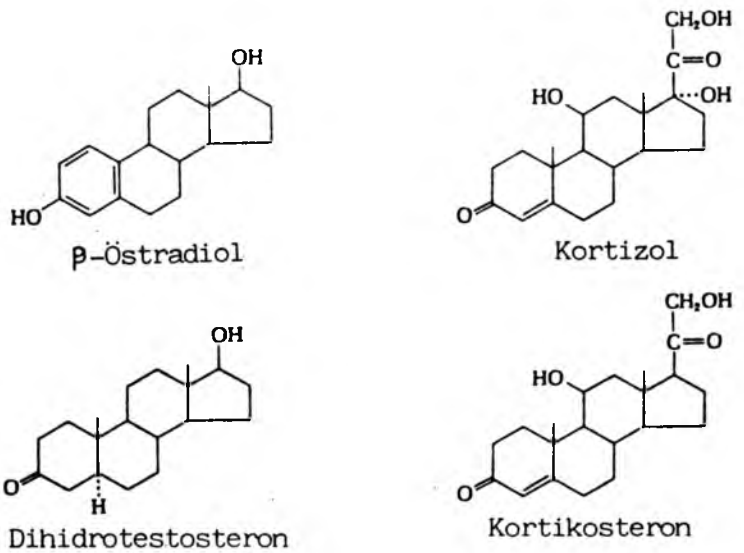
18.7. STEROİD HORMONLARI

Çoğu steroid hormonlarının çok spesifik fonksiyon göstermelerine ve metabolizma üzerine genel etkileri olmamasına rağmen, yeni araştırmalarla biyokimyasal etki tarzları hakkında çok şey öğrenmiş bulunulmaktadır. Başlıca steroid hormonları şunlardır: Östrojenler veya dişi cinsiyet hormonları (en önemlileri 17(β)östradiol ve östrondur), androjenler veya erkek cinsiyet hormonları (testosteron, dihidrotestosteron), progesteron ve böbrek üstü kabuğunun steroid hormonları (özellikle kortizol, aldosteron ve kortikosteron). Bu hormonların bazılarının yapısı Şekil 18.8'de gösterilmiştir. Cinsiyet hormonları esasen cinsiyet organları üzerine etki yaptıkları halde, böbreküstü kabuğu vasıtasıyla salgılanan steroid hormonları birçok dokularda karbohidrat ve protein metabolizması üzerine esaslı etkiler gösterirler.

Steroid hormonları spesifik reseptörlere bağlanırlar. Meselâ işaretli küçük miktardaki östradiol, uterus dokusu veya homojenatıyla inkübe edildiğinde iki hücre fraksiyonu olan sitozol ve hücre çekirdeğine bağlanır. Östradiol sitozolde spesifik bir reseptör proteinine bağlanır. Östrojen ise çekirdekte kromatinde bulunmuştur. Bu hormonla reaksiyon vermeyen dokular ilgili reseptörleri ihtiva etmezler. Östrojenin hedef hücrenin sitozolündeki reseptör proteini çok küçük miktarda olmasına rağmen, östrojene fevkalâde yüksek afinite gösterir (östrojen-reseptör kompleksinin ayrışma sabiti 10^{-9}-10^{-12} M arasındadır).

Benzer reseptör proteinler diğer steroid hormonları için de bulunmuştur (androjenler için prostat dokusundaki reseptörler gibi). Progesteronun bir spesifik reseptörü, tavukların yumurta kanalı dokusunda B.W.O'Malley ve arkadaşları tarafından ortaya çıkarılmıştır. Progesteronun bağlanması, progesteron-reseptör kompleksinin sitozolden hücre çekirdeğine kaymasına sebep olur. Kompleks, çekirdekte kromatine bağlanır ve DNA'ya bağımlı RNA-polimeraz aktivitesini artırır ve mRNA oluşumu hızlanır; mRNA'da yumurta kanalında büyük miktarda sentezlenen yumurta al-

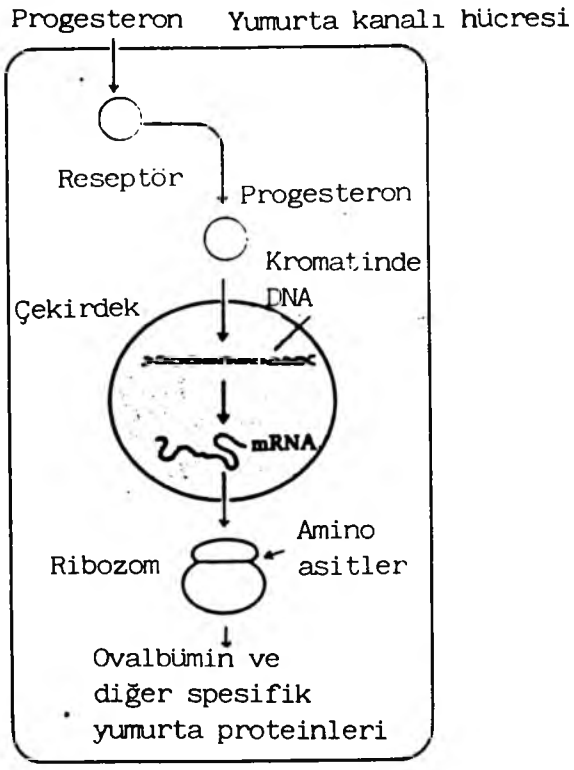
bümini ve avidin gibi değişik proteinleri kodlar (Şekil 18.9). Bu deneylere göre progesteron ve muhtemelen diğer steroid hormonlarının etkileri,hedef hücrelerinin çekirdeğinde belirli genlerin transkripsiyon hızlarının modülasyonu üzerindengerçekleşmektedir.



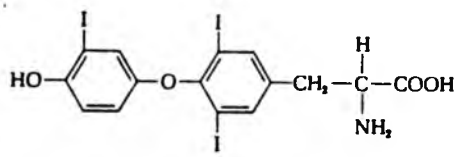
Şekil 18.8. En önemli steroid hormonları. Testosteron, progesteron, östron, kortizon ve aldosteronun yapıları s. 175'te verildiğinden buraya alınmamıştır.

18.8. TİROİD BEZİ HORMONLARI

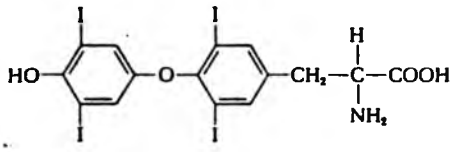
Tiroid bezinin karakteristik hormonları tiroksin ve 3,5,3'-triiyodotironindir(Şekil 18.10). Bu hormonların insan ve hayvanların bazal metabolizması üzerindeki fizyolojik etkileri uzun zamandan beri bilinmesine rağmen, biyokimyasal etki tarzları tam manasıyla henüz bilinmemektedir. Basedow hastalığının sebebi hipertireoz denilen tiroid bezi hormonlarının fazla salgılanması olduğu gibi, hipotireoz denilen tiroid bezi hormonlarının eksik salgılanması da miksödeme götürür.



Şekil 18.9. Yumurta kanalı hücresi üzerine progesteronun etkisinin şematik gösterilişi.



3,5,3'-Triiyodotironin



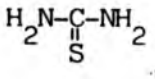
Tiroksin

Şekil 18.10. Tiroid bezi hormonları.

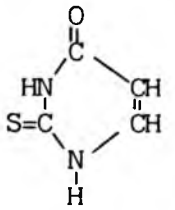
Bazal metabolizma tabirinden yatan ve tamamen dinlenmede olan, fakat uyumayan bir şahsın oksijen sarfiyatı anlaşılmaktadır. Bazal metabolizmanın ölçümü yemekten en az 12 saat sonra alınır. Bu m^2 ve saat başına üretilen ısı enerjisi (kcal) veya oksijen sarfiyatı olarak ölçülür; zira gıda maddelerinin yanmasından açığa çıkan enerji ve oksijen sarfiyatı arasında direkt bir bağlantı vardır.

Hipertireozda bazal metabolizma normal seviyenin %20-80 kadar üzerine çıkar. Tiroid bezinin hiper fonksiyon gösterdiği hastalarda tiroid bezinin bir kısmının uzaklaştırılmasıyla toplam salgılanma azalır ve bazal metabolizma normal değere düşer. Tersi durumunda ise tiroid bezi hormonu verilir. Hemen hemen bütün organların oksijen sarfiyatı tiroid bezi hormonları vasıtasıyla etkilenir; en önemli istisna beyindir.

Tiroksin ve 3,5,3'-triiyodotironin, tirozinin iyodlanmış türevleridir. Tiroksin triiyodotironinden çok daha büyük miktarda sentezlenmesine rağmen, triiyodotironin 5-10 kat daha aktiftir. Bu hormonların sentezi için gerekli iyodür dolaşımla tiroid bezine gelir; burada peroksidaz enzimi vasıtasıyla tirozinin iyot türevlerine dönüşür. Bu sırada önce 3,5-diiyodotirozin oluşur, daha sonra bu da tiroksine ve 3,5,3'-triiyodotironine dönüşür. Bu hormonlar, tiroid bezinde bulunan büyük bir glikoprotein olan tiroglobulinin tirozin kalıntılarından meydana gelirler. Tiroglobulin biyolojik olarak aktif değildir, bununla birlikte hormonları proteolizden sonra kana verir. Kana salınan hormonlar, "tiroksin bağlayan globulin" adı verilen spesifik bir glikoproteinle (M.A. 55.000) taşınırlar. Tiroid bezi hormonlarının biyosentezi, tiyoüre ve tiyourasille inhibe edilir.



Tiyoüre



2-Tiyourasil

Tiroksin vasıtasıyla dokuların oksijen sarfiyatının uyarılmasının tam mekanizması, çok yoğun biyokimyasal araştırmalara rağmen uzun yıllar anlaşılamamıştır. Tiroksin, başta mitokondrilerdeki gliserol-3-fosfat dehidrogenaz olmak üzere, solunum zincirine iştirak eden birçok enzimin konsantrasyonunu artırır. Yine tiroksin ADP'nin yokluğunda karaciğer mitokondrilerinin solunum oranını artırır ve mitokondrilerin şişmesine sebep olur. Az miktarda tiroksin kurbağa yavrularının metamorfozunu uyarır ve metabolizma olaylarında değişiklikler gözlenir. Azotun atılması şekli NH_4^+'dan üreye değişir; bu, üre oluşumu için gerekli olan karbamoilfosfat sentetaz ve diğer enzimlerin çok kuvvetli bir artışıyla mümkün olur. Radyoaktif tiroksinin kurbağa yavrusunun karaciğer hücrelerinin kromatinine çok sıkı bağlandığı tesbit edilmiştir.

18.9. PARATHORMON, 1,25-DİHİDROKSİKOLEKALSİFEROL VE KALSİTONİN

Bu üç hormon memeli hayvanlarda Ca^{+2} ve fosfat metabolizmasının düzenlenmesinde önemli roller oynarlar. Bunların tam etki tarzları anlaşılmamasına rağmen, önemli biyokimyasal aşamalara varılmıştır. Kanda Ca^{+2} konsantrasyonu normal değerin altına düşer düşmez, paratiroid bezinden kana parathormon salgılanır. 84 amino asitli bir polipeptid olan bu hormon, önce böbreklere etki eder ve adenilat siklazı uyarır. cAMP'nin artışı idrarda fosfat atılımını sağlar, böylece kanda fosfat konsantrasyonu düşer. Parathormon, böbreklerde 25-hidroksikolekalsiferolden 1,25-dihidroksikolekalsiferolün sentezini de uyarır. 1,25-Dihidroksikolekalsiferol, böbreklerden salgılanır ve ince bağırsaklar ile kemikler üzerine etki eder. 1,25-Dihidroksikolekalsiferol, bağırsaklardan Ca^{+2}'nin absorbsiyonunu kolaylaştırır; bunu bağırsağın epitel hücrelerinde bir Ca^{+2} bağlayan proteinin biyosentezini spesifik yapısal genin üzerindeki baskıyı kaldırmakla uyarır. Parathormon bundan başka kemiklerden Ca^{+2}'nin salınmasını da uyarır.

Tiroid bezi ve paratiroid bezinden salgılanan bir başka polipeptid hormon olan kalsitonin, 32 amino asit ihtiva eder (M.A. 4500). Bu hormon esas itibariyle kemikleri etkiler, bununla birlikte böbrekleri de etkiler. Kanda Ca^{+2} muhtevasında artış, kalsitonin salgılanması artar. Kalsitonin kemiklerden kana Ca^{+2}'nin salınmasını inhibe eder ve böylece parathormonun zıt düzenleyicisi olarak etki gösterir.

KAYNAKLAR

1- Bennet, P.T. and Friden, E., (1973), Biyokimyada Modern Konular (Çeviri : A.Günalp), Ankara, M.E.B. Modern Matematik ve Fen Kitapları Yayınları.

2- Bingöl, G., (1983), Biyokimya, Ankara, Hacettepe-Taş Kitapçılık Ltd. Şti., 3.Baskı.

3- Harper, H.A., (1975), Review of physiological chemistry, California, Lange Medical Publications, 15 th edition.

4- Karlson, P., (1988), Tıp ve Fen Bilimciler için Biyokimya (Çeviri : A. Telefoncu), Kırklareli, Arkadaş Tıp Kitapları.

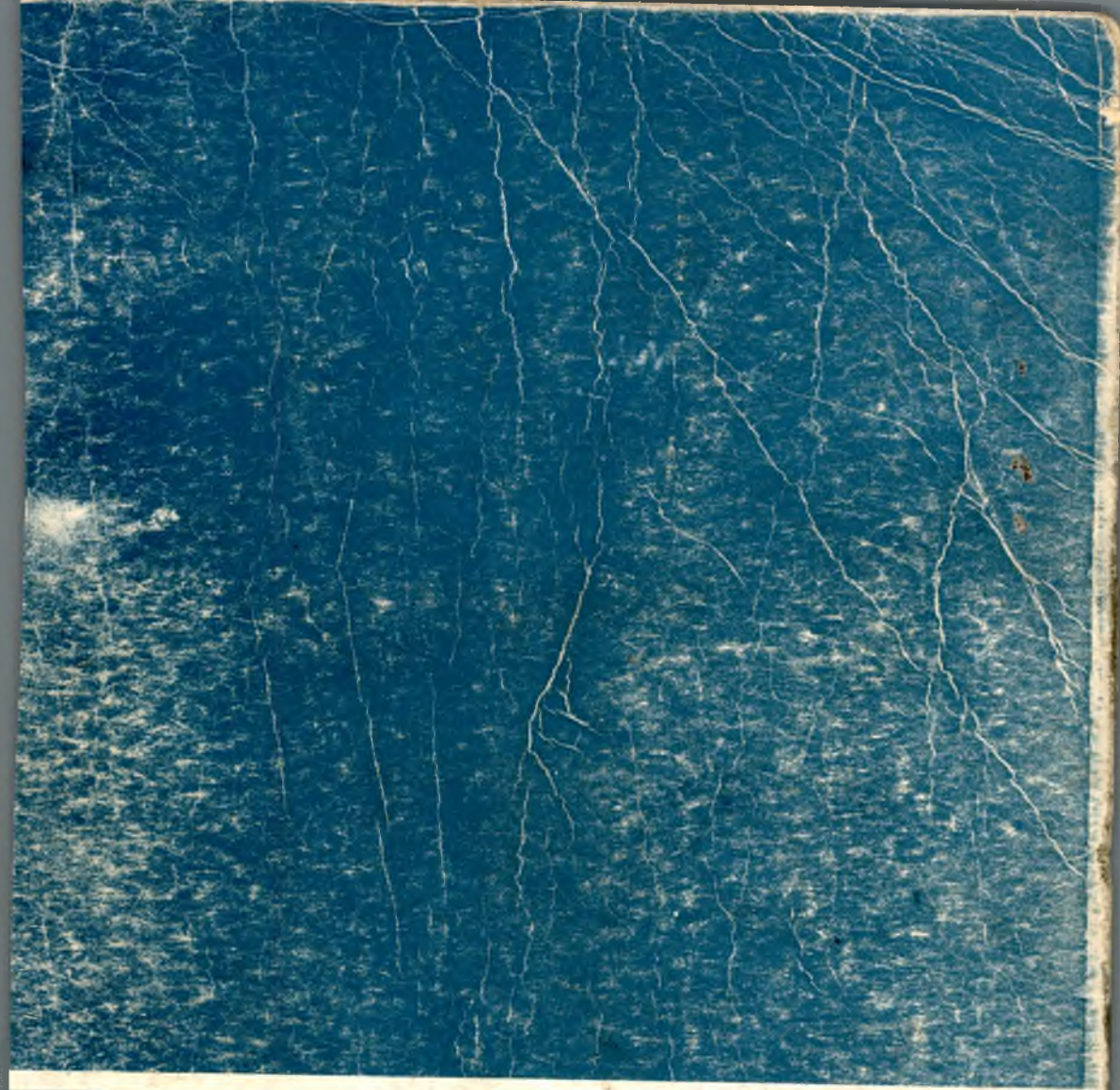
5- Karol, S. ve grubu, (1980), Modern Biyoloji, Ankara, M.E.B. Modern Matematik ve Fen Kitapları Yayınları.

6- Lehninger, A.L., (1983), Biochemie (übersetzt von H. Kleinig und B. Liedvogel), Weinheim, Verlag Chemie, 2. Auflage.

7- Ökten, M., (1973), Biyolojinin Moleküler Temelleri, Ankara, M.E.B. Modern Matematik ve Fen Kitapları Yayınları.

8- Rafelson, M.E., Binkley, S.B. and Hayashi, J.A., (1971), Basic Biochemistry, New York, Macmillan Company, 3 rd edition.

9- Stryer, L., (1988), Biochemistry, New York, W.H. Freeman and Company, 3 nd edition.

10-Tekman, Ş. ve Öner, N., (1981), Genel Biokimya Dersleri, İstanbul, İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, 3.baskı.

11-Yüregir, G, (1981), Temel Biyokimya, Adana, Çukurova Üniversitesi, Tıp Fakültesi Yayınları.